



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **10057074 A**(43) Date of publication of application: **03 . 03 . 98**

(51) Int. Cl

C12N 15/09
A61K 38/00
A61K 38/00
A61K 38/00
A61K 48/00
C07K 14/78
C12N 1/19
C12N 1/21
C12N 5/10
C12P 21/02
C12Q 1/48

(21) Application number: **09091584**(22) Date of filing: **26 . 03 . 97**

(30) Priority: **20 . 11 . 95 JP 07325130**
05 . 12 . 95 JP 07344605
05 . 01 . 96 JP 08 17151

(62) Division of application: **08201325**(71) Applicant: **KIRIN BREWERY CO LTD**

(72) Inventor: **KAIBUCHI KOZO**
NAKANO TAKESHI
ITO MASAOKI
IWAMATSU AKIHIKO
TAKAHASHI NOBUAKI

(54) **PHYSIOLOGICALLY ACTIVE PROTEIN P138**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new protein, comprising a peptide having a modified amino acid sequence of a myosin-bonding subunit and having the ability to bond to an active type Rho protein and further a site to be phosphorylated and useful for treatment, etc., of tumor, cardiac and cerebral infarctions.

SOLUTION: This new protein or its modified protein comprises a peptide or a protein having a modified amino acid sequence or a myosin-bonding subunit or its equivalent sequence and has the ability to bond to an active type Rho protein and further a site to be phosphorylated present in its structure. The new protein

is used as a therapeutic agent, etc., for diseases concerned with the active type Rho protein for treatment, etc., of tumorigenesis, infiltration or metastasis of cancer, diseases causing the acceleration of cell aggregation (cardiac infarction, cerebral infarction, inflammatory thrombosis, etc.), circulatory diseases causing the acceleration of contraction in smooth muscles (hypertension, arteriosclerosis, asthma, etc.), etc. The protein is obtained by separating a crude membrane fraction from a bovine cerebra cinerea homogenate, extracting the resultant homogenate with a buffer and purifying the extract solution with an affinity column.

COPYRIGHT: (C)1998,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-57074

(43) 公開日 平成10年(1998) 3月3日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	9282-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 38/00	A B E		A 6 1 K 48/00	A D U
	A B R		C 0 7 K 14/78	
	A C B		C 1 2 N 1/19	
48/00	A D U		1/21	

審査請求 未請求 請求項の数43 F D (全 36 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-91584
(62) 分割の表示 特願平8-201325の分割
(22) 出願日 平成8年(1996) 7月11日

(31) 優先権主張番号 特願平7-325130
(32) 優先日 平7(1995)11月20日
(33) 優先権主張国 日本 (J P)
(31) 優先権主張番号 特願平7-344605
(32) 優先日 平7(1995)12月5日
(33) 優先権主張国 日本 (J P)
(31) 優先権主張番号 特願平8-17151
(32) 優先日 平8(1996) 1月5日
(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000253503
麒麟麦酒株式会社
東京都中央区新川二丁目10番1号
(72) 発明者 貝 淵 弘 三
奈良県生駒市北大和2-22-24
(72) 発明者 中 野 赳
三重県津市長岡町3002-2
(72) 発明者 伊 藤 正 明
三重県津市淡見町722-28
(72) 発明者 岩 松 明 彦
神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-5 麒麟
麦酒株式会社基盤技術研究所内
(74) 代理人 弁理士 佐藤 一雄 (外3名)
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生理活性タンパク質 p 138

(57) 【要約】

【課題】 活性型 R h o タンパク質結合能を有するタンパク質の提供。

【解決手段】 ミオシン結合サブユニットの改変アミノ酸配列またはその等価配列を有するペプチドまたはタンパク質であって、該配列が活性型 R h o タンパク質結合能を有するか、または該配列の構造中に被リン酸化部位が存在するペプチドまたはタンパク質。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 活性型R h oタンパク質結合能を有し、かつその構造中に被リン酸化部位が存在する、タンパク質またはその改変タンパク質。

【請求項2】 活性型R h oタンパク質結合能を有するか、またはその構造中に被リン酸化部位が存在する、タンパク質またはその改変タンパク質。

【請求項3】 R h oタンパク質が、R h o Aタンパク質、R h o Bタンパク質、R h o Cタンパク質、またはR h o Gタンパク質である、請求項1または2に記載のタンパク質またはその改変タンパク質。

【請求項4】 活性型R h oタンパク質結合能を有し、かつプロテインキナーゼ活性を有するタンパク質によって被リン酸化部位が特異的にリン酸化されるものである、請求項1または2に記載のタンパク質またはその改変タンパク質。

【請求項5】 ミオシン結合サブユニットの改変アミノ酸配列またはその等価配列を有するペプチドまたはタンパク質であって、該配列が活性型R h oタンパク質結合能を有するペプチドまたはタンパク質。

【請求項6】 ミオシン結合サブユニットの改変アミノ酸配列またはその等価配列を有するペプチドまたはタンパク質であって、該配列の構造中に被リン酸化部位が存在するペプチドまたはタンパク質。

【請求項7】 ミオシン結合サブユニットの改変アミノ酸配列またはその等価配列を有するペプチドまたはタンパク質であって、該配列が活性型R h oタンパク質結合能を有し、かつ該配列の構造中に被リン酸化部位が存在するペプチドまたはタンパク質。

【請求項8】 R h oタンパク質が、R h o Aタンパク質、R h o Bタンパク質、R h o Cタンパク質、またはR h o Gタンパク質である、請求項5または7に記載のペプチドまたはタンパク質。

【請求項9】 活性型R h oタンパク質結合能を有し、かつプロテインキナーゼ活性を有するタンパク質によって被リン酸化部位が特異的にリン酸化されるものである、請求項6または7に記載のペプチドまたはタンパク質。

【請求項10】 ミオシン軽鎖フォスファターゼ触媒サブユニットおよび／またはミオシン結合能を有さない、請求項5～9いずれか一項に記載のペプチドまたはタンパク質。

【請求項11】 ミオシン結合サブユニットが動物由来のものである、請求項5～10いずれか一項に記載のペプチドまたはタンパク質。

【請求項12】 ミオシン結合サブユニットがウシ、ラット、ニワトリ、またはヒト由来のものである、請求項11に記載のペプチドまたはタンパク質。

【請求項13】 配列番号1に記載されるアミノ酸配列の1～707番の配列もしくは699～976番の配列またはそれらの改変アミノ酸配列、またはそれらの等価配

列からなるものである、請求項5～12いずれか一項に記載のペプチドまたはタンパク質。

【請求項14】 配列番号1に記載されるアミノ酸配列の1～707番の配列もしくは699～976番の配列またはそれらの改変アミノ酸配列、またはそれらの等価配列を含んでなるものである請求項5～12いずれか一項に記載のペプチドまたはタンパク質。

【請求項15】 配列番号3に記載される全アミノ酸配列もしくはその754～1030番の配列、またはそれらの改変アミノ酸配列もしくはそれらの等価配列からなるものである、請求項5～12のいずれか一項に記載のペプチドまたはタンパク質。

【請求項16】 配列番号3に記載される全アミノ酸配列もしくはその754～1030番の配列、またはそれらの改変アミノ酸配列もしくはそれらの等価配列からなるものである、請求項5～12のいずれか一項に記載のペプチドまたはタンパク質。

【請求項17】 配列番号1に記載されるアミノ酸配列の1～707番の配列もしくは699～976番の配列またはそれらの改変アミノ酸配列、またはそれらの等価配列からなるものである、ペプチドまたはタンパク質。

【請求項18】 配列番号1に記載されるアミノ酸配列の1～707番の配列もしくは699～976番の配列またはそれらの改変アミノ酸配列、またはそれらの等価配列を含んでなるものである、ペプチドまたはタンパク質。

【請求項19】 配列番号3に記載される全アミノ酸配列もしくはその754～1030番の配列、またはそれらの改変アミノ酸配列もしくはそれらの等価配列からなる、ペプチドまたはタンパク質。

【請求項20】 配列番号3に記載される全アミノ酸配列もしくはその754～1030番の配列、またはそれらの改変アミノ酸配列もしくはそれらの等価配列を含んでなる、ペプチドまたはタンパク質。

【請求項21】 請求項5～20いずれか一項に記載のペプチドまたはタンパク質をコードする、塩基配列。

【請求項22】 請求項21に記載の塩基配列を含んでなる、ベクター。

【請求項23】 プラスミドベクター、ウイルスベクター、およびリポソームベクターからなる群から選択されるものである、請求項22に記載のベクター。

【請求項24】 請求項22または23に記載のベクターによって形質転換された、宿主細胞（ただし、ヒト細胞にあつてはヒトから単離された細胞に限る）。

【請求項25】 大腸菌、酵母、昆虫細胞、COS細胞、NIH/3T3細胞、リンパ細胞、繊維芽細胞、CHO細胞、血液系細胞、腫瘍細胞からなる群から選択されるものである、請求項24に記載の宿主細胞。

【請求項26】 請求項24または25に記載の宿主細胞を培養し、そして培養物から請求項5～20いずれか一

項に記載のペプチドまたはタンパク質を採取することを含んでなる、請求項5～20いずれか一項に記載のペプチドまたはタンパク質の製造法。

【請求項27】ミオシン結合サブユニットまたは請求項1～20いずれか一項に記載のペプチドもしくはタンパク質を含んでなる、R h oタンパク質が関与する疾患の治療剤。

【請求項28】ミオシン結合サブユニットまたは請求項1～20いずれか一項に記載のペプチドもしくはタンパク質をコードする塩基配列を含んでなる、R h oタンパク質が関与する疾患の治療用遺伝子治療剤。

【請求項29】(1)スクリーニングの対象となる物質を、活性型R h oタンパク質とミオシン結合サブユニットまたは請求項1～20いずれか一項に記載のペプチドもしくはタンパク質とを含むスクリーニング系に存在させ、そして(2)活性型R h oタンパク質とミオシン結合サブユニットまたは請求項1～20いずれか一項に記載のペプチドもしくはタンパク質との結合の阻害の程度を測定することを含んでなる、活性型R h oタンパク質とミオシン結合サブユニットまたは請求項1～20いずれか一項に記載のタンパク質もしくはペプチドとの結合を阻害する物質のスクリーニング法。

【請求項30】スクリーニング系に、更に、活性型R h oタンパク質のG T P a s e活性化タンパク質を存在させる、請求項29に記載のスクリーニング系。

【請求項31】スクリーニング系が細胞系または無細胞系である、請求項29または30に記載のスクリーニング法。

【請求項32】スクリーニング系が、酵母ツー・ハイブリッド・システムである、請求項28または29に記載のスクリーニング法。

【請求項33】ミオシン結合サブユニットまたは請求項1～20いずれか一項に記載のペプチドもしくはタンパク質がインビトロ・トランスレーションにより発現されたものである、請求項29～31いずれか一項に記載のスクリーニング法。

【請求項34】腫瘍形成もしくは転移、細胞凝集、または平滑筋の収縮を抑制する物質のスクリーニング法である、請求項29～34のいずれか一項に記載のスクリーニング法。

【請求項35】(1)スクリーニングの対象となる物質を、活性型R h oタンパク質結合能を有し、かつプロテインキナーゼ活性を有するタンパク質と、ミオシン軽鎖、ミオシン結合サブユニット、ミオシン軽鎖フォスファターゼまたは請求項1～20いずれか一項に記載のペプチドもしくはタンパク質とを含むスクリーニング系に存在させ、そして(2)ミオシン軽鎖、ミオシン結合サブユニット、ミオシン軽鎖フォスファターゼまたは請求項1～20いずれか一項に記載のペプチドもしくはタンパク質のリン酸化の阻害の程度を測定することを含んで

なる、ミオシン軽鎖、ミオシン結合サブユニット、軽鎖フォスファターゼまたは請求項1～20いずれか一項に記載のペプチドもしくはタンパク質のリン酸化を阻害する物質のスクリーニング法。

【請求項36】(1)スクリーニングの対象となる物質を、活性型R h oタンパク質結合能を有し、かつプロテインキナーゼ活性を有するタンパク質と、ミオシン軽鎖フォスファターゼと、リン酸供与体と、既リン酸化物質とを含むスクリーニング系に存在させ、そして(2)ミオシン軽鎖フォスファターゼの活性の阻害の程度を測定することを含んでなる、ミオシン軽鎖フォスファターゼの活性の阻害を抑制する物質のスクリーニング法。

【請求項37】リン酸供与体が、A T PまたはA T P γ Sである、請求項36に記載のスクリーニング法。

【請求項38】既リン酸化物質が、リン酸化ミオシン軽鎖である、請求項36に記載のスクリーニング法。

【請求項39】スクリーニング系に、更に、R h oタンパク質を存在させる、請求項35～38いずれか一項に記載のスクリーニング法。

【請求項40】R h oタンパク質が翻訳後修飾されたものである、請求項39に記載のスクリーニング法。

【請求項41】スクリーニング系が細胞系または無細胞系である、請求項33～40いずれか一項に記載のスクリーニング法。

【請求項42】(1)スクリーニングの対象となる物質を、R h oタンパク質と、ミオシン軽鎖とを含んでなる細胞スクリーニング系に存在させ、そして(2)ミオシン軽鎖のリン酸化の阻害の程度を測定することを含んでなる、ミオシン軽鎖のリン酸化を阻害する物質のスクリーニング法。

【請求項43】腫瘍形成もしくは転移、細胞凝集、または平滑筋の収縮を抑制する物質のスクリーニング法である、請求項33～42いずれか一項に記載のスクリーニング法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の背景】

発明の分野

本発明は、活性型R h oタンパク質結合能を有する新規なタンパク質に関する。

【0002】背景技術

生体内には、サブユニット構造を有さない分子量2～3万の一群の低分子量G T P結合タンパク質(Gタンパク質)が存在している。現在、低分子量Gタンパク質のスーパーファミリーには酵母から哺乳動物に至るまでに50種類以上のメンバーが見い出されている。低分子量Gタンパク質は、アミノ酸配列の類似性から、R a s、R h o、R a b、その他の4つのファミリーに大別することができる。さらに、R h oファミリーは、R h oタンパク質、R a cタンパク質、C d c 4 2タンパク

質のサブファミリーに大別される。この低分子量Gタンパク質は種々の細胞機能を制御していることが明らかになってきており、例えば、Rasファミリーのタンパク質は細胞の増殖や分化を、Rhoファミリーのタンパク質は細胞の形態変化、細胞接着、細胞凝集、細胞運動、細胞分裂等を制御していると考えられている。

【0003】Rhoファミリーのタンパク質は、他の低分子量GTP結合タンパク質と同様に、GDP/GTP結合能およびGTPase活性を示し、GDPと結合した不活性型またはGTPと結合した活性型として存在し、GDP/GTP交換反応やGTPaseによる反応により相互に変換される。GDP/GTP交換反応は、Smg GDS、Dbl、Ost、Tiam-1のようなGDP/GTP交換促進タンパク質やRho GDIのようなGDP/GTP交換抑制タンパク質により制御されている。GTPase反応は、Rho GTPase活性化タンパク質(GAP)、即ち、Ras GAPと結合しているp190 (Settleman J. et al., Nature, 359, 153-154(1992)), Rho GAP (Lancaster C. A. et al., J. Biol. Chem., 269, 1137-1142 (1994))、およびRho GAP p122 (Homma Y. & Emori Y., EMBO J., 14, 286-291(1995))、により制御されている。

【0004】天然のRhoAタンパク質のC末端にはCys-A-A-Leu (Aは脂肪族アミノ酸) 構造が存在し、Cys残基にグラニルグラニル基転移酵素の働きによりグラニルグラニル基が結合し、さらにCys残基のカルボキシル基がメチル化される。この脂質による翻訳後修飾は、Rhoタンパク質の細胞膜への結合や活性制御タンパク質との相互作用に必要であるとともに、その機能の発現にも必要であると考えられている (Imazumi, K. et al., 実験医学 13, 646-656(1995))。RhoAタンパク質、RhoBタンパク質、RhoCタンパク質、Rac1タンパク質、Rac2タンパク質、Cdc42タンパク質のようなRhoファミリーのタンパク質のアミノ酸配列は、お互いに50%以上の類似性がある。このRhoファミリーのタンパク質は、リゾファスファチジル酸や増殖因子のような細胞外シグナルにตอบสนองして、ストレス繊維(stress fiber)やフォーカルコンタクト(focal contact)の形成を引き起こす反応に関与していると考えられている (Ridley A. J. & Hall A., Cell, 70, 389-399 (1992)、Ridley A. J. & Hall A., EMBO J., 13, 2600-2610 (1994))。また、Rhoファミリーのタンパク質は、細胞の形態変化 (Paterson H. F. et al., J. Cell Biol., 111, 1001-1007(1990))、細胞凝集 (Tominaga T. et al., J. Cell Biol., 120, 1529-1537(1993)、Morii, N. et al., J. Biol. Chem. 267, 20921-20926(1992))、細胞運動 (Takaishi K. et al., Oncogene, 9, 273-279(1994))、細胞質分裂(cytokinesis) (Kishi K. et al., J. Cell Biol., 120, 1187-1195 (1993)、Mabuc

hi I. et al., Zygote, 1, 325-331(1993))のような細胞骨格の再編成をともなった生理機能にも関連があると考えられている。更に、サブファミリーであるRhoタンパク質は、平滑筋収縮 (Hirata K. et al., J. Biol. Chem., 267, 8719-8722(1992))、フォスファチジルイノシトール3-キナーゼ (PI 3-キナーゼ) (Zhang J. et al., J. Biol. Chem., 268, 22251-22254 (1993))、フォスファチジルイノシトール4-リン酸5-キナーゼ (PI 4, 5-キナーゼ) (Chong L. D. et al., Cell, 79, 507-513(1994))やc-fosの発現 (Hill C. S. et al., Cell, 81, 1159-1170 (1995))の制御にも関与していることが示唆されている。

【0005】前述の様に、細胞外シグナルの刺激により、Rhoファミリーのタンパク質がGDP結合型の不活性型からGTP結合型の活性型に変換されるが、その結果としてGTP結合型Rhoタンパク質(以下「活性型Rhoタンパク質」という)が特異的なターゲットに結合することにより、固有の生理機能が引き起こされることが想定されている (Nobes C. D. & Hall A., Curr-Opi n-Genet-Dev., 4, 77-81(1994))。

【0006】ところで、ミオシン軽鎖のリン酸化は、血管収縮薬により誘導される平滑筋の収縮に重要な役割を果たす (Kamm, K. E. & Stull, J. T., Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 25, 593-603(1985))、また、非筋肉細胞で、細胞外の信号にตอบสนองしたミオシンと細胞骨格の結合およびその結果誘導される細胞骨格の再構成にも重要な役割を果たすことが知られている (Jennings, L. K. et al., J. Biol. Chem. 256, 6927-6932(1981)、Fox, J. E. & Phillips, D. R., J. Biol. Chem. 257, 4120-4126(1982))。更に、ミオシン軽鎖のリン酸化は、ミオシン軽鎖キナーゼとミオシン軽鎖フォスファターゼによって特異的に制御されることが知られている (Kamm, K. E. & Stull, J. T., Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 25, 593-603(1985))。

【0007】ここで、ミオシン軽鎖フォスファターゼは、少なくとも2つのサブユニット、即ちミオシン結合サブユニットおよびフォスファターゼ触媒サブユニットから成る。ミオシン結合サブユニットの明確な機能は未だ明かになっていないが、ミオシン結合サブユニットはリン酸化ミオシンへ直接結合することによって、ミオシンに対するフォスファターゼ触媒サブユニットのフォスファターゼ活性を増強すると考えられている。また、ニワトリおよびラット由来のcDNAからミオシン結合サブユニットのアミノ酸配列が推定されている (Shimizu, H. et al., J. Biol. Chem. 269, 30407-30411(1994)、Chen, Y. H. et al., FEBS Lett. 356, 51-55 (1994))。しかしながら、本発明者らが知る限りでは、ヒト由来のミオシン結合サブユニットのcDNAは未だ単離されておらず、従ってそのアミノ酸配列は不明である。

【0008】Ca²⁺は平滑筋の収縮やミオシンと細胞骨格との結合を誘導するが、これはCa²⁺がカルモジ

ユリン依存性ミオシン軽鎖キナーゼを活性化することにより、ミオシン軽鎖をリン酸化し、ミオシンATPaseを活性化することによる(Kamm, K. E. & Stull, J. T., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 25, 593-603(1985)、Jennings, L. K. et al., *J. Biol. Chem.* 256, 6927-32 (1981)、Fox, J. E. & Phillips, D. R., *J. Biol. Chem.* 257, 4120-4126(1982))。

【0009】しかし、細胞質の Ca^{2+} 濃度は平滑筋の収縮と常に比例関係になく、従って、平滑筋の収縮を制御するさらに別の機構があるとされている(Bradley, A. B. & Morgan, K. G., *J. Physiol.* 385, 437-448 (1987))。即ち、加水分解しないGTPの類似体であるGTP γ Sは、膜透過処理した平滑筋において、収縮に必要な Ca^{2+} 濃度を下げるため、GTP結合蛋白質が Ca^{2+} の感受性を制御している可能性が示唆されている(Kitazawa, T. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9307-9310 (1991)、Moreland, S. et al., *Am. J. Physiol.* 263, C540-C544 (1992))。また、平滑筋において、Rhタンパク質は、GTPが増強する Ca^{2+} 感受性に関与していることが示唆されている(Hirata, K. et al., *J. Biol. Chem.* 267, 8719-8722(1992))。さらに、最近明らかになった事実によって、GTP γ Sは、膜透過処理した平滑筋において、Rhタンパク質によるミオシン軽鎖フォスファターゼ活性の抑制を介して、最大下(sub maximal)の Ca^{2+} 濃度で、ミオシン軽鎖のリン酸化を増大させるという可能性が示唆された(Noda, M. et al., *FEBS Lett.* 367, 246-250(1995))。

【0010】しかしながら、ミオシン軽鎖フォスファターゼとRhタンパク質とが直接相互作用するとの報告は、本発明者が知る限りなされていない。

【0011】

【発明の概要】今般、本発明者らは、活性型Rhタンパク質とグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)との融合タンパク質を固定化したグルタチオン・セファロース・カラム・クロマトグラフィーを用いて、Rhタンパク質と結合するシグナル伝達タンパク質を解析した。その結果、ミオシン軽鎖フォスファターゼが、GTP γ S・GST-Rhアフィニティー・カラムに吸着すること、インビトロ・トランスレーションにより作製したミオシン結合サブユニットがGTP γ S・GST-Rhに結合すること、組換えミオシン結合サブユニットがp122Rh-GAPによって刺激される活性型Rhタンパク質のGTPase活性を抑制すること、分子量約164kDaのタンパク質が特異的にGTP γ S・GST-Rhアフィニティー・カラムに吸着すること、そしてこのタンパク質がタンパク質キナーゼ活性を有し、ミオシン結合サブユニットを強くリン酸化することを見出した。本発明はかかる知見に基づくものである。

【0012】即ち、本発明は、活性型Rhタンパク質

結合能を有するか、またはその構造中に被リン酸化部位が存在するホ乳類由来のタンパク質であるタンパク質(以下「p138タンパク質」という)およびその改変タンパク質の提供をその目的とする。

【0013】また、本発明は、活性型Rhタンパク質結合能を有するか、またはその構造中に被リン酸化部位が存在するミオシン結合サブユニットの改変アミノ酸配列またはその等価配列を有するペプチドまたはタンパク質、ミオシン結合サブユニット等を含んでなるRhタンパク質が関与する疾患の治療剤、ミオシン結合サブユニット等をコードする塩基配列を含んでなるRhタンパク質が関与する疾患の治療用遺伝子治療剤、活性型Rhタンパク質とミオシン結合サブユニットとの結合を阻害する物質のスクリーニング法、およびミオシン結合サブユニットのリン酸化を阻害する物質のスクリーニング法の提供をその目的とする。

【0014】

【発明の具体的説明】

p138タンパク質

p138タンパク質は、活性型Rhタンパク質結合能を有する。ここで、Rhタンパク質としては、RhAタンパク質、RhBタンパク質、RhCタンパク質、またはRhGタンパク質が挙げられる。

【0015】本発明において、「活性型Rhタンパク質結合能を有する」タンパク質とは、当業者により活性型Rhタンパク質と結合したと認められたと評価されるタンパク質をいい、例えば、実施例1、3または4と同様の条件において実験した場合に活性型Rhタンパク質と結合したと認められたと評価されるタンパク質を意味するものとする。

【0016】本発明において、「その構造中に被リン酸化部位が存在する」タンパク質とは、プロテインキナーゼによりリン酸化される部位をその構造中に有するタンパク質をいい、例えば、実施例5、実施例7または実施例8と同様の条件において実験した場合にリン酸化されたと認められたと評価されるタンパク質を意味するものとする。また、この「被リン酸化部位」は、活性型Rhタンパク質結合能を有し、かつプロテインキナーゼ活性を有するタンパク質(以下「p164」という)によって特異的にリン酸化されるとの性質を有する。ウシ脳由来のp164は、SDS-PAGEによる測定で約164kDaの分子量を有する。ここで、「特異的に」とは、p164は該タンパク質(の被リン酸化部位)をリン酸化するが、他の基質タンパク質のリン酸化の程度はこれより弱い、あるいは全くないことを意味するものとする。

【0017】本発明において、「改変タンパク質」とは、p138タンパク質のアミノ酸配列についてアミノ酸の付加、挿入、欠失または置換等の改変が生じたものであり、かつ少なくとも活性型Rhタンパク質結合能、

R h o G A Pにより刺激される活性型R h oタンパク質のG T P a s eの抑制活性、またはプロテインキナーゼ（特にp 1 6 4）によってリン酸化される基質タンパク質の性質のいずれかを有するものである。以下、「本発明によるp 1 3 8タンパク質」という場合は、改変タンパク質も包含されるものとする。

【0018】本発明によるp 1 3 8タンパク質は、活性型R h oタンパク質結合能を有し、かつその構造中に被リン酸化部位が存在するものであってもよい。本発明によるp 1 3 8タンパク質は、動物（例えば、ホ乳類）を由来とするものである。本発明によるタンパク質の起源としては、例えば、ニワトリ、ラット、ウシ、ヒト等が挙げられる。

【0019】本発明によるp 1 3 8タンパク質は、活性型R h oタンパク質に結合するものである。また、R h oタンパク質は、血小板やリンパ球の凝集、細胞形態、細胞運動、細胞質分裂等の細胞の機能発現に密接に関わっている（前掲Ridley A. J. & Hall A., Cell, 70, 389-399 (1992)、Ridley A. J. & Hall A., EMBO J., 13, 2600-2610 (1994)、Paterson H. F. et al., J. Cell Biol., 111, 1001-1007 (1990)、Tominaga T. et al., J. Cell Biol., 120, 1529-1537 (1993)、Morii, N. et al., J. Biol. Chem. 267, 20921-20926 (1992)、Takaishi K. et al., Oncogene, 9, 273-279 (1994)、Kishi K. et al., J. Cell Biol., 120, 1187-1195 (1993)、Mabuchi I. et al., Zygote, 1, 325-331 (1993)）。

【0020】また、R h oタンパク質は下記の様に腫瘍の形成、転移に密接に関わっている。R h oタンパク質を活性化するG D P / G T P交換促進タンパク質のうち、D b 1 (Hart M. J. et al., J. Biol. Chem. 269, 62-65 (1994)) およびO s t (Horii Y. et al., EMBO J. 13, 4776-4786 (1994)) はガン原遺伝子である。さらに、最近、R h oタンパク質が細胞周期の促進 (Olson M. F. et al., Science, 1270-1272 (1995))、ガン原遺伝子c - f o sの発現 (Hill C. S. et al., Cell, 81, 1159-1170 (1995))、腫瘍の形成 (Prendergast G. C. et al., Oncogene 10, 2289-2296 (1995)、Khosravi-Far et al., Mol. Cell. Biol. 15, 6443-6453 (1995))、ガンの浸潤および転移 (Yoshioka K. et al., FEBS Lett., 372, 25-28 (1995)) に関与することが明らかにされた。

【0021】従って本発明によるp 1 3 8タンパク質は、細胞の機能解明、特に腫瘍形成および転移、血管平滑筋の収縮、血小板凝集や炎症の機序の解明、に有用である。

【0022】活性型R h oタンパク質結合性タンパク質本発明によれば、ミオシン結合サブユニットの改変アミノ酸配列またはその等価配列を有するペプチドまたはタンパク質であって、該改変アミノ酸配列が活性型R h oタンパク質結合能を有するもの（以下「活性型R h oタンパク質結合性タンパク質」という）、が提供される。

ここで、「改変アミノ酸配列」とは、あるアミノ酸配列においてアミノ酸の付加、挿入、削除、欠失または置換などにより改変されたアミノ酸配列をいう。従って、ミオシン結合サブユニットの全アミノ酸配列の一部の配列から構成されるミオシン結合サブユニットの部分アミノ酸配列であって、活性型R h oタンパク質結合能を有するものも「ミオシン結合サブユニットの改変アミノ酸配列」の一態様である。

【0023】ミオシン結合サブユニットの全アミノ酸配列は、例えば、ラットおよびニワトリをその起源とするものは公知であり、このうちラット由来のミオシン結合サブユニットの配列は配列番号1に記載される通りである。ラットおよびニワトリのミオシン結合サブユニットの配列と相同性を有するラットおよびニワトリ以外の種（例えば、ヒト、ウシ、ブタ、ウサギ、マウス、カエル、ショウジョウバエ、線虫、酵母等）のタンパク質の全アミノ酸配列も、ここにいうミオシン結合サブユニットの全アミノ酸配列に含まれるものとする。さらに、本発明者等は、ヒト由来のミオシン結合サブユニットの全アミノ酸配列を今般決定した。その配列は配列番号3に記載の通りである。ミオシン結合サブユニットの起源は特に限定されず、ラット、ニワトリ、ウシおよびヒトを含む動物由来のものであっても、それ以外を由来とするものであってもよい。

【0024】本発明によるペプチドまたはタンパク質は、活性型R h oタンパク質結合能を有する。ここで、R h oタンパク質としては、R h oタンパク質が、R h o Aタンパク質、R h o Bタンパク質、R h o Cタンパク質、およびR h o Gタンパク質等が挙げられる。

【0025】本発明において、「活性型R h oタンパク質結合能を有する」アミノ酸配列とは、p 1 3 8タンパク質で定義された意味と同様の意味内容を表すものとする。本発明において「等価配列」とは、アミノ酸配列においてアミノ酸の付加、挿入、削除、欠失または置換などの改変があっても、改変前の配列と同じ機能を有することを意味し、例えば、活性型R h oタンパク質との結合能を有する改変アミノ酸配列において、アミノ酸の付加、挿入、削除、欠失または置換などの改変が生じたアミノ酸配列であって、依然として活性型R h oタンパク質との結合能を有するものを意味する。

【0026】本発明による活性型R h oタンパク質結合性タンパク質の具体例としては、配列番号1に記載されるアミノ酸配列の1～707番の配列もしくは699～976番の配列またはそれらの改変アミノ酸配列、またはそれらの等価配列からなるもの、および配列番号1に記載されるアミノ酸配列の1～707番の配列もしくは699～976番の配列またはそれらの改変アミノ酸配列、またはそれらの等価配列を含んでなるもの、が挙げられる。また、本発明による活性型R h oタンパク質結合性タンパク質の別の具体例としては、配列番号3に記

載される全アミノ酸配列およびその754~1030番の配列、またはそれらの改変アミノ酸配列もしくはそれらの等価配列からなるもの、ならびに配列番号3に記載される全アミノ酸配列もしくはその754~1030番の配列、またはそれらの改変アミノ酸配列もしくはそれらの等価配列を含んでなるもの、が挙げられる。ここにいる「改変アミノ酸配列」とは、前述した内容と同様の内容を意味するものとする。例えば、配列番号1に記載されるアミノ酸配列の1~707番の配列または699~976番の配列の部分アミノ酸配列またはその等価配列であって、活性型Rhオタンパク質結合能を有するものもここにいう改変アミノ酸配列の一態様である。

【0027】本発明による活性型Rhオタンパク質結合性タンパク質は、活性型Rhオタンパク質結合能を有するミオシン結合サブユニットの改変アミノ酸配列を含んでなるものである。また、活性型Rhオタンパク質は前記のように血小板やリンパ球の凝集、腫瘍の形成、転移をはじめとして細胞形態、細胞運動、細胞質分裂等の細胞の機能発現に密接に関わっている。従って、本発明による活性型Rhオタンパク質結合性タンパク質は、細胞の機能解明、特に腫瘍形成および転移、血管平滑筋の収縮、血小板凝集や炎症の機序の解明、に有用である。

【0028】被リン酸化部位存在タンパク質

本発明によれば、ミオシン結合サブユニットの改変アミノ酸配列またはその等価配列を有するペプチドまたはタンパク質であって、該改変アミノ酸配列がその構造中に被リン酸化部位が存在するもの（以下「被リン酸化部位存在タンパク質」という）、が提供される。ここで、

「改変アミノ酸配列」とは、活性型Rhオタンパク質結合性タンパク質で定義された意味と同様の意味内容を表すものとする。例えば、ミオシン結合サブユニットの全アミノ酸配列の一部の配列から構成される部分アミノ酸配列であって、その構造中に被リン酸化部位が存在するものも「ミオシン結合サブユニットの改変アミノ酸配列」の一態様である。

【0029】ミオシン結合サブユニットの全アミノ酸配列は、例えば、ラットおよびニワトリをその起源とするものは公知であり、その配列は配列番号1に記載される通りである。ラットおよびニワトリのミオシン結合サブユニットの配列と相同性を有するラットおよびニワトリ以外の種（例えば、ヒト、ウシ、ブタ、ウサギ、マウス、カエル、ショウジョウバエ、線虫、酵母等）のタンパク質の全アミノ酸配列も、ここにいるミオシン結合サブユニットの全アミノ酸配列に含まれるものとする。ヒトについては、その全アミノ酸配列が配列番号3として記載されていることは前記した通りである。ミオシン結合サブユニットの起源は特に限定されず、ウシおよびヒトを含む哺乳類由来のものであっても、それ以外を由来とするものであってもよい。

【0030】本発明において、「その構造中に被リン酸

化部位が存在する」アミノ酸配列とは、p138タンパク質で定義された意味と同様の意味内容を表すものとする。本発明において「等価配列」とは、アミノ酸配列においてアミノ酸の付加、挿入、削除、欠失または置換などの改変があっても、改変前の配列と同じ機能を有することを意味し、例えば、その構造中に被リン酸化部位が存在する改変アミノ酸配列において、アミノ酸の付加、挿入、削除、欠失または置換などの改変が生じたアミノ酸配列であって、依然としてその構造中に被リン酸化部位が存在するものを意味する。

【0031】本発明による被リン酸化部位存在タンパク質の具体例としては、配列番号1に記載されるアミノ酸配列の699~976番の配列またはそれらの改変アミノ酸配列、またはそれらの等価配列からなるもの、および配列番号1に記載されるアミノ酸配列の699~976番の配列またはそれらの改変アミノ酸配列、またはそれらの等価配列を含んでなるもの、が挙げられる。ここにいる「改変アミノ酸配列」とは、前述した内容と同様の内容を意味するものとする。例えば、配列番号1に記載されるアミノ酸配列の699~976番の配列の部分アミノ酸配列またはその等価配列であって、p164によって被リン酸化部位が特異的にリン酸化されるものもここにいる改変アミノ酸配列の一態様である。また、p164によるこの部分配列のリン酸化は、活性型Rhオタンパク質の存在下で著明に亢進される。

【0032】本発明による被リン酸化部位存在タンパク質は、活性型Rhオタンパク質結合能を有するミオシン結合サブユニットの改変アミノ酸配列を含んでなるものである。また、活性型Rhオタンパク質は前記のように血小板やリンパ球の凝集、腫瘍の形成、転移をはじめとして細胞形態、細胞運動、細胞質分裂等の細胞の機能発現に密接に関わっている。従って、本発明による被リン酸化部位存在タンパク質は、細胞の機能解明、特に腫瘍形成および転移、血管平滑筋の収縮、板凝集や炎症の機序の解明、に有用である。

【0033】本発明においては、活性型Rhオタンパク質結合性タンパク質はその構造中に被リン酸化部位が存在するものであってもよく、また、被リン酸化部位存在タンパク質は活性型Rhオタンパク質結合能を有するものであってもよい。すなわち、本発明によれば、ミオシン結合サブユニットの改変アミノ酸配列またはその等価配列を有するペプチドまたはタンパク質であって、該配列が活性型Rhオタンパク質結合能を有し、かつ該配列の構造中に被リン酸化部位が存在するもの、が提供される。

【0034】以下、「本発明によるペプチドまたはタンパク質」という場合には、活性型Rhオタンパク質結合性タンパク質および被リン酸化部位存在タンパク質に加えて上記タンパク質を含む意味で用いられるものとする。

【0035】本発明によるペプチドまたはタンパク質は、ミオシン軽鎖フォスファターゼ触媒サブユニットおよび／またはミオシン結合能を有さないものであってもよい。ここで、「結合能を有さないタンパク質」とは、当業者によりミオシン軽鎖フォスファターゼ触媒サブユニットおよび／またはミオシンとの結合が認められないと評価されるタンパク質をいい、例えば実施例1または3、あるいは前掲H. Simizu, et al. (1994)と同様の条件において実験した場合に、ミオシン軽鎖フォスファターゼ触媒サブユニット等との結合が認められないと評価されるタンパク質を意味するものとする。

【0036】本発明の別の面によれば、配列番号1に記載されるアミノ酸配列の1～707番の配列もしくは699～976番の配列またはそれらの改変アミノ酸配列からなるペプチドまたはタンパク質、および配列番号1に記載されるアミノ酸配列の1～707番の配列もしくは699～976番の配列またはそれらの改変アミノ酸配列を含んでなるペプチドまたはタンパク質が提供される。また、本発明の別の面によれば、配列番号3に記載される全アミノ酸配列およびその754～1030番の配列、またはそれらの改変アミノ酸配列もしくはそれらの等価配列からなるペプチドまたはタンパク質、ならびに配列番号3に記載される全アミノ酸配列もしくはその754～1030番の配列、またはそれらの改変アミノ酸配列もしくはそれらの等価配列を含んでなるペプチドまたはタンパク質が提供される。以下、「本発明によるペプチドまたはタンパク質」という場合には、更に上記ペプチドまたはタンパク質を含む意味で用いられるものとする。

【0037】ペプチドまたはタンパク質をコードする塩基配列

本発明によれば、本発明によるペプチドまたはタンパク質をコードする塩基配列が提供される。この塩基配列の典型的配列は、配列番号2および4に記載されるDNA配列の一部または全部を有するものである。更に、前記したように本発明は、配列番号1に示されるアミノ酸配列の部分配列、配列番号3に記載されるアミノ酸配列の全配列およびその部分配列の等価配列をも包含するものである。従って、本発明による塩基配列には、更にこの等価配列をコードする塩基配列も包含される。なお、本明細書において塩基配列とは、DNA配列およびRNA配列のいずれをも意味するものとする。

【0038】前記改変アミノ酸配列が与えられれば、それをコードする塩基配列は容易に定まり、配列番号1に記載されるアミノ酸配列ならびに部分配列、配列番号3に記載されるアミノ酸配列の全配列およびその部分配列その等価配列をコードする種々の塩基配列を選択することができる。従って、本発明によるペプチドまたはタンパク質をコードする塩基配列とは、配列番号2および4に記載される一部または全部のDNA配列に加え、同一

のアミノ酸をコードする配列であって縮重関係にあるコドンとDNA配列として有する配列をも意味するものとし、更にこれらに対応するRNA配列も含まれる。

【0039】本発明による塩基配列は、天然由来のものであっても、全合成したものであってもよい。また、天然物由来のものの一部を利用して合成を行ったものであってもよい。DNAの典型的な取得方法としては、染色体ライブラリーまたはcDNAライブラリーから遺伝子工学の分野で慣用されている方法、例えば部分アミノ酸配列の情報を基にして作成した適当なDNAプローブを用いてスクリーニングを行う方法、等が挙げられる。

【0040】本発明による塩基配列としては、例えば、配列番号2に記載されるDNA配列の2185～3018番の配列、または配列番号4に記載されるDNA配列の2260～3090番の配列からなる配列が挙げられる。

【0041】ベクターおよび形質転換された宿主細胞

本発明によれば、前記の本発明による塩基配列を、宿主細胞内で複製可能でかつその塩基配列がコードするタンパク質を発現可能な状態で含んでなるベクターが提供される。更に、本発明によれば、このベクターによって形質転換された宿主細胞が提供される。この宿主ベクター系は特に限定されず、また、他のタンパク質との融合タンパク質発現系などを用いることができる。融合タンパク質発現系としては、MBP（マルトース結合タンパク質）、GST（グルタチオン-S-トランスフェラーゼ）、HA（ヘマグルチニン）、myc、Fas等を用いたものが挙げられる。

【0042】ベクターとしては、プラスミドベクター

（例えば、原核細胞、酵母、昆虫細胞、動物細胞等での発現ベクター）、ウイルスベクター（例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、センダイウイルスベクター、HIVベクター）、リポソームベクター（例えば、カチオンリポソームベクター）等が挙げられる。

【0043】本発明によるベクターは、これを実際に宿主細胞に導入して所望のアミノ酸配列を発現させるためには、前記の本発明による塩基配列の他に、その発現を制御する配列や微生物または動物培養細胞等を選択するための遺伝子マーカー等を含んでいてもよい。また、このベクターは、本発明による塩基配列を反復した形（タンデム）で含んでいてもよい。これらは常法に従いベクターに存在させてよく、このベクターによる微生物または動物培養細胞等の形質転換の方法も、この分野で慣用されているものを用いることができる。

【0044】本発明によるベクター構築の手順および方法は、遺伝子工学の分野で慣用されているものを用いることができる。また、宿主細胞としては、例えば、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞（例えば、COS細胞、

リンパ球、繊維芽細胞、NIH/3T3細胞、CHO細胞、血液系細胞、腫瘍細胞等）が挙げられる。

【0045】上記形質転換された宿主細胞を適当な培地で培養し、その培養物から上記した本発明による改変アミノ酸配列またはその等価配列を有するペプチドまたはタンパク質を得ることができる。従って、本発明の別の態様によれば、本発明による改変アミノ酸配列またはその等価配列を有するペプチドまたはタンパク質の製造法が提供される。形質転換された宿主細胞の培養およびその条件は、使用する細胞についてのそれと本質的に同様であってよい。また、培養液からの本発明による改変アミノ酸配列等の回収、精製も常法に従って行うことができる。

【0046】タンパク質の用途

本発明によれば、ミオシン結合サブユニットおよび活性型Rh oタンパク質結合性タンパク質は、活性型Rh oタンパク質結合能を有する。従って、ミオシン結合サブユニット等を用いて活性型Rh oタンパク質を中和することにより、活性型Rh oタンパク質からその標的タンパク質へのシグナル伝達を遮断できると考えられる。また、Rh oタンパク質は腫瘍の形成または転移、ガンの浸潤や転移、細胞凝集、平滑筋の収縮に関与していることが示されている（前掲Prendergast, G. C. et al., K hosravi-Far et al., Yoshioka K. et al., Tominaga, T. et al., Morii, N. et al., Hirata, K. et al., Nob a, M. et al.,）。

【0047】本発明者らは、ミオシン軽鎖フォスファターゼおよびそのサブユニットの一つであるミオシン結合サブユニットが、p 1 6 4の最も適した生理的基質の一つであるとの知見を得た（実施例5、実施例7および実施例8）。また、ミオシン軽鎖フォスファターゼに含まれるミオシン結合サブユニットがリン酸化されると該フォスファターゼ活性が抑制されるとの知見を得た（実施例7および実施例8）。更に、p 1 6 4タンパク質を内因的に発現していると考えられる細胞においてRh oタンパク質を発現させると、ミオシン結合サブユニットおよびミオシン軽鎖がリン酸化されるとの知見を得た（実施例8）。これらの知見に基づき、Rh oタンパク質は下記のメカニズムで平滑筋収縮を促進すると考えられる。

(1) 活性型Rh oタンパク質がミオシン結合サブユニットへ結合するとともに活性型Rh oタンパク質がp 1 6 4に結合する。

(2) 活性型Rh oタンパク質との結合に依存してp 1 6 4がミオシン結合サブユニットをリン酸化する。

(3) リン酸化を受けたミオシン結合サブユニットにより、フォスファターゼ触媒サブユニットのミオシン軽鎖フォスファターゼ活性が抑制される。

(4) ミオシン軽鎖フォスファターゼ活性が抑制されるため、ミオシンの脱リン酸化が阻害される。

(5) 脱リン酸化が抑制された結果、ミオシンはアクチンから脱重合できなくなる。

(6) 以上の結果、平滑筋収縮が亢進されるとともに収縮が持続する。

この機構は、平滑筋収縮のみならず、Rh oタンパク質が関与する腫瘍の形成または転移、ガンの浸潤や転移、細胞凝集にも関わっている可能性が高い。

【0048】従って、ミオシン結合サブユニットまたは活性型Rh oタンパク質結合性タンパク質を投与することによって、あるいはこれらをヒトを含む生体内で発現させることによって、活性型Rh oタンパク質がミオシン結合サブユニット等に結合し、その結果として活性型Rh oタンパク質からミオシン軽鎖フォスファターゼ等の標的タンパク質へのシグナル伝達が遮断され、Rh oタンパク質が関与する腫瘍の形成または転移、ガンの浸潤や転移、細胞凝集、平滑筋の収縮を抑制できると考えられる。

【0049】活性型Rh oタンパク質結合性タンパク質および被リン酸化部位存在タンパク質は、その構造中にそれぞれ活性型Rh oタンパク質結合部位および被リン酸化部位が存在するものである。また、その一態様として、ミオシン軽鎖フォスファターゼ触媒サブユニットおよび／またはミオシン結合能を有さないものが挙げられる。因に、ミオシン結合サブユニットは、活性型Rh oタンパク質結合能および被リン酸化部位存在タンパク質という性質の他にミオシン結合能および触媒サブユニット結合能という性質が存在する。前掲Shimizu H. et al. (1994)によれば、ミオシン軽鎖フォスファターゼの機能の内、ミオシン結合能および触媒サブユニット結合能は、N末端側の58 kDa断片に存在するとされる。

【0050】従って、活性型Rh oタンパク質結合性タンパク質または被リン酸化部位存在タンパク質であって、ミオシン軽鎖フォスファターゼ触媒サブユニットおよび／またはミオシン結合能を有さないタンパク質を投与するか、あるいは、これらをヒトを含む生体内で発現させると、これらのタンパク質等は活性型Rh oタンパク質に結合するか、またはp 1 6 4によりリン酸化を受けるが、ミオシンや触媒サブユニットに結合できないので、ヒトを含む生体内での活性型Rh oタンパク質による内在性のミオシン軽鎖フォスファターゼの抑制を阻害することができ、結果としてミオシンの脱リン酸化の抑制を阻害できると考えられる。従って、活性型Rh oタンパク質結合性タンパク質または被リン酸化部位存在タンパク質であって、ミオシン軽鎖フォスファターゼ触媒サブユニットおよび／またはミオシン結合能を有さないものは、Rh oタンパク質が関与する腫瘍の形成または転移、ガンの浸潤や転移、細胞凝集、平滑筋の収縮を抑制できると考えられる。

【0051】従って、本発明のもう一つの態様として、ミオシン結合サブユニットまたは本発明によるタンパク

質もしくはペプチドを含んでなる、活性型R h oタンパク質が関与する疾患の治療剤が提供される。

【0052】ここで、「ミオシン結合サブユニット」は、p138タンパク質を含む意味で用いられるものとする。また、ミオシン結合サブユニットの起源はヒト、ウシ等を含む哺乳類由来のものであっても、それ以外を由来とするものであってもよい。

【0053】また、「ミオシン結合サブユニット」はその改変タンパク質を含む意味で用いられるものとし、ここにいう「改変タンパク質」とは、p138タンパク質において定義された意味と同様の意味内容を表すものとする。

【0054】「活性型R h oタンパク質が関与する疾患」としては、腫瘍の形成（例えば、他の低分子量Gタンパク質（例えば、R a sタンパク質、R a cタンパク質、c d c 42タンパク質、R a lタンパク質等）が関与する腫瘍の形成、低分子量Gタンパク質の活性化タンパク質（例えば、D b l 1、O s t等）が関与する腫瘍の形成、受容体型チロシンキナーゼ（例えば、PDGF受容体、EGF受容体等）、または転写制御タンパク質（m y c、p 53等）が関与する腫瘍の形成、リソフォスファチジン酸（W. H. Moolenaar, J. Biol. Chem. 270, 12949-12952 (1995)）が関与する腫瘍の形成、ガンの浸潤や転移、細胞凝集の亢進を伴う疾患（例えば、心筋梗塞、脳梗塞、炎症血栓症等）、平滑筋の収縮の亢進を伴う種々の循環器系疾患（例えば、高血圧、血管攣縮、動脈硬化、喘息等）等が挙げられる。

【0055】本発明の治療剤は、その疾患に応じて具体的に、腫瘍形成または転移抑制剤、血小板凝集阻害剤、抗炎症剤、循環器系疾患（例えば、高血圧、血管攣縮、動脈硬化、喘息、心筋梗塞、脳梗塞）治療剤であることができる。

【0056】本発明による治療剤は、また、経口または非経口投与（例えば、筋注、静注、皮下投与、直腸投与、経皮投与、経鼻投与など）、好ましくは経口投与することができ、薬剤として経口または非経口投与に適した種々の剤形で、ヒトおよびヒト以外の動物に使用される。

【0057】R h oタンパク質が関与する疾患の治療剤は、例えばその用途に応じて、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、丸剤、細粒剤、トローチ錠などの経口剤、静注および筋注などの注射剤、直腸投与剤、油脂性坐剤、水溶性坐剤などのいずれかの製剤形態に調製することができる。これらの各種製剤は、通常用いられている賦形剤、増量剤、結合剤、湿潤化剤、崩壊剤、表面活性剤、潤滑剤、分散剤、緩衝剤、保存剤、溶解補助剤、防腐剤、矯味矯臭剤、無痛化剤、安定化剤などを用いて常法により製造することができる。使用可能な無毒性の上記添加剤としては、例えば乳糖、果糖、ブドウ糖、でん粉、ゼラチン、炭酸マグネシウム、合成ケイ酸マグネシ

ウム、タルク、ステアリン酸マグネシウム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースまたはその塩、アラビアゴム、ポリエチレングリコール、シロップ、ワセリン、グリセリン、エタノール、プロピレングリコール、クエン酸、塩化ナトリウム、亜硫酸ソーダ、リン酸ナトリウムなどが挙げられる。

【0058】薬剤中におけるペプチドまたはタンパク質の含有量はその剤形に応じて異なるが、通常全組成物中約0.1〜約50重量%、好ましくは約1〜約20重量%濃度である。投与量は、用法、患者の年齢、性別、症状の程度などを考慮して適宜決定されるが、通常成人1日当たり約0.1〜約500mg、好ましくは約0.5〜約50mg程度とするのがよく、これを1日1回または数回に分けて投与することができる。

【0059】本発明の更にもう一つの面として、ミシオン結合サブユニットまたは本発明によるペプチドもしくはタンパク質をコードする塩基配列を含んでなる、R h oタンパク質が関与する疾患の治療用遺伝子治療剤が提供される。この遺伝子治療剤は、ミシオン結合サブユニットまたは本発明によるペプチドもしくはタンパク質をコードする塩基配列を有する前記ベクターを用いて標的細胞を形質転換し、例えば、腫瘍の形成または転移を抑制する様な態様で用いることができる。

【0060】形質転換される細胞としては、ガン患者体内のガン細胞、例えば、骨髄性白血病細胞、リンパ性白血病細胞、肺ガン細胞、大腸ガン細胞、胃ガン細胞、膵臓ガン細胞、乳ガン細胞、腎ガン細胞、頭頸部ガン細胞、肝臓ガン細胞、皮膚ガン細胞、脳腫瘍細胞等が挙げられる。

【0061】前記の本発明によるタンパク質等をコードする塩基配列を有するベクターをヒトを含む生体内のガン細胞に適当な方法によって導入することによって、悪性腫瘍等について遺伝子治療を行うことができる。遺伝子治療用のベクターについては、高久史磨監修の実験医学（増刊号）第12巻、第15号「遺伝子治療の最前線」（1994年）を参照することができる。

【0062】スクリーニング法

本発明によれば、（1）スクリーニングの対象となる物質を、活性型R h oタンパク質とミオシン結合サブユニットまたは本発明によるペプチドもしくはタンパク質とを含むスクリーニング系に存在させ、そして（2）活性型R h oタンパク質とミオシン結合サブユニットまたは本発明によるペプチドもしくはタンパク質との結合の阻害の程度を測定することを含んでなる、活性型R h oタンパク質とミオシン結合サブユニットまたは本発明によるペプチドもしくはタンパク質との結合を阻害する物質のスクリーニング法が提供される。

【0063】ここで、「結合の阻害の程度を測定する方法」としては、無細胞系での組換え型G T P γ S・G S T-R h o Aタンパク質との結合をグルタチオン・セフ

アロースビーズを用いて測定する方法、オーバーレイ・アッセイを用いて測定する方法 (Mancer, E. et al. J. Biol. Chem. 267, 16025-16028 (1992))、Rh o タンパク質 GAP による Rh o タンパク質 GTPase 活性化の抑制の程度を測定する方法等が挙げられ、例えば、実施例 1、3、4 および 6 に記載される方法に準じて結合の阻害の程度を測定することができる。上記スクリーニング系には、更に、活性型 Rh o タンパク質の GTPase 活性化タンパク質を存在させてもよい。

【0064】スクリーニング系は細胞系または無細胞系のいずれであってもよく、細胞系としては、例えば、酵母細胞、NIH/3T3 細胞、COS 細胞が挙げられる。細胞系は、Rh o タンパク質、p164、ミオシン結合サブユニット等を発現しているものであってもよい。また、スクリーニングは、酵母ツー・ハイブリッド・システム (two hybrid system) (M. Kawabata 実験医学13, 2111-2120(1995)、A. B. Vojetk et al. Cell 74, 205-214(1993)) により行うこともできる。スクリーニングの対象となるものは、特に限定されないが、例えばペプチド、ペプチドのアナログ、微生物培養液、有機化合物等が挙げられる。

【0065】本発明による上記スクリーニング法においては、インビトロ・トランスレーションにより発現させたミオシン結合サブユニットまたは本発明によるペプチドもしくはタンパク質を用いることもできる。

【0066】本発明によれば、また、(1)スクリーニングの対象となる物質を、p164と、ミオシン軽鎖、ミオシン結合サブユニット、ミオシン軽鎖フォスファターゼまたは本発明によるペプチドもしくはタンパク質を含むスクリーニング系に存在させ、そして(2)ミオシン軽鎖、ミオシン結合サブユニット、ミオシン軽鎖フォスファターゼまたは本発明によるペプチドもしくはタンパク質のリン酸化を阻害する物質のスクリーニング法が提供される。

【0067】ミオシン結合サブユニット等のリン酸化の阻害の程度を測定する方法としては、キナーゼである p164 によるミオシン結合サブユニットまたはミオシン軽鎖フォスファターゼのリン酸化の程度を測定する方法が挙げられ、例えば、実施例 5 または 7 に記載される方法に準じて配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 699~976 番の配列からなるタンパク質と MBP (マルトース結合タンパク質) との融合タンパク質または天然のミオシン軽鎖フォスファターゼを用いて、リン酸化の阻害の程度を測定することができる。

【0068】ここで、p164 は、活性型 Rh o タンパク質結合能を有し、かつプロテインキナーゼ活性を有するタンパク質である。ウシ脳由来の p164 は、SDS

-PAGE による測定で約 164 kDa の分子量を有する。また、p164 は、活性型 Rh o タンパク質と結合することによってそのプロテインキナーゼ活性が亢進されるとの性質を有する。ここで「プロテインキナーゼ活性」とは、セリン/スレオニン・プロテインキナーゼ活性を含む意味で用いられるものとする。

【0069】本発明において、p164 にはその改変タンパク質も含まれるものとする。「改変タンパク質」とは、p164 のアミノ酸配列についてアミノ酸の付加、挿入、欠失または置換等の改変が生じたものであり、かつ少なくとも活性型 Rh o タンパク質結合能およびプロテインキナーゼ活性を有するものである。p164 の起源は特に限定されず、ウシおよびヒトを含む哺乳類由来のものであっても、それ以外を由来とするものであってもよい。

【0070】上記スクリーニング系に、更に、Rh o タンパク質 (好ましくは、活性型 Rh o タンパク質) が存在するとミオシン結合サブユニット等のリン酸化が亢進される。従って、スクリーニング系に Rh o タンパク質を存在させるとスクリーニングをより明確に行うことができる。

【0071】後記する実施例において示されているように、翻訳後修飾を受けた Rh o タンパク質は、翻訳後修飾を受けない Rh o タンパク質よりも p164 のプロテインキナーゼ活性を亢進する。従って、Rh o タンパク質として翻訳後修飾を受けたものを用いると、本発明によるスクリーニングをより明確に行うことができる。スクリーニング系およびスクリーニング系の対象は、前記スクリーニング法と同様のものが挙げられる。

【0072】上記スクリーニング法には、(1)スクリーニングの対象となる物質を、Rh o タンパク質と、ミオシン軽鎖とを含んでなる細胞スクリーニング系に存在させ、そして(2)ミオシン軽鎖のリン酸化の阻害の程度を測定することを含んでなる、ミオシン軽鎖のリン酸化を阻害する物質のスクリーニング法も含まれる。

【0073】本発明によれば、更に、(1)スクリーニングの対象となる物質を、p164 と、ミオシン軽鎖フォスファターゼと、リン酸供与体と、そして既リン酸化物質を含むスクリーニング系に存在させ、そして

(2)ミオシン軽鎖フォスファターゼの活性の阻害の程度を測定することを含んでなる、ミオシン軽鎖フォスファターゼの活性の阻害を抑制する物質のスクリーニング法が提供される。

【0074】ここで、リン酸供与体としては、ATP および ATP γ S 等が挙げられ、ATP γ S が好ましい。リン酸供与体は、p164 によるミオシン軽鎖フォスファターゼのリン酸化に際しリン酸基を提供する。

【0075】既リン酸化物質とは、その物質内にオルトリン酸エステル、ポリリン酸等が存在するものをいう。既リン酸化物質は、フォスファターゼの基質となり、フ

オスファターゼの作用によってそのリン酸エステル結合が加水分解される。既リン酸化物質としては、リン酸化(monophosphorylated またはdiphosphorylated) -ミオシン軽鎖等が挙げられる。

【0076】ミオシン軽鎖フォスファターゼは、生体(例えば、ニワトリ、ラット、ウシ)から抽出した天然由来のものであっても、市販のものであってもよく、これらに限定されるものではない。例えば、Shimizu, H. et al., J. Biol. Chem., 269, 30407-30411(1994)、Chen, Y. H. et al., FEBS Lett. 356, 51-55(1994) または実施例1に記載される方法に従って調製することができる。

【0077】ミオシン軽鎖フォスファターゼの活性の阻害の程度を測定する方法としては、リン酸化-ミオシン軽鎖の脱リン酸化の程度を測定する方法が挙げられ、例えば、実施例7および実施例8に記載される方法に準じてフォスファターゼ活性の阻害の程度を測定することができる。

【0078】上記スクリーニング系に、更に、Rhodanパク質活性型Rhodanパク質が存在するとミオシン軽鎖フォスファターゼのサブユニットの一つであるミオシン結合サブユニット等のリン酸化が亢進される。また、ミオシン軽鎖フォスファターゼは、p164によってリン酸化されることによってそのフォスファターゼ活性が抑制される。従って、上記スクリーニング系にRhodanパク質を存在させるとスクリーニングをより明確に行うことができる。

【0079】後記する実施例において示されているように、翻訳後修飾を受けたRhodanパク質は、翻訳後修飾を受けないRhodanパク質よりもp164のプロテインキナーゼ活性を亢進する。従って、Rhodanパク質として翻訳後修飾を受けたものを用いると、本発明によるスクリーニングをより明確に行うことができる。

【0080】スクリーニング系およびスクリーニング系の対象は、前記スクリーニング法と同様のものが挙げられる。

【0081】活性型Rhodanパク質は、前記のように、腫瘍形成または転移、細胞凝集、平滑筋の収縮等に密接に関わっていることが確認されている。特に、活性型Rhodanパク質とミオシン軽鎖フォスファターゼとは、前記のように、ミオシン結合サブユニットを介して平滑筋の収縮等に密接に関わっている。従って、上記3つのスクリーニング法は、腫瘍形成または転移、細胞凝集、または平滑筋の収縮を抑制する物質のスクリーニング法、特に平滑筋の収縮を抑制する物質のスクリーニング法、としても用いることができる。

【0082】

【実施例】本発明を以下の実施例によって詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1 活性型Rhodanパク質結合タンパク質の精製

(1) 脳膜抽出液の調製

ウシ脳灰白質(190g)を鉄で切って小片にし、300mlのホモジェナイズ用バッファー(25mM Tris/HCl (pH7.5), 5mM EGTA, 1mM ジチオスレイトール(DTT), 10mM MgCl₂, 10μM (p-アミジノフェニル)-メタンシルホニルフルオリド, 1μg/l ロイペプチン, 10% スクロース)に懸濁した。懸濁液をPotter-Elvehjemテフロン・ガラス・ホモジェナイザーでホモジェナイズし、4層のガーゼで濾過した。ホモジェネートを20,000×gで30分間、4℃で遠心分離した。沈殿物を360mlのホモジェナイズ用バッファーに懸濁し、粗膜画分を得た。この画分の中に含まれる蛋白質を等量の、4M NaClを含むホモジェナイズ用バッファーを加えて抽出した。4℃で、1時間振とうした後、膜画分を、20,000×g、4℃で1時間遠心した。上清をバッファーA(20mM Tris/HCl, pH7.5, 1mM EDTA, 1mM DTT, 5mM MgCl₂)に対して、3回透析した。固形硫酸を最終濃度が40%飽和濃度になるように加えた。0-40%の沈殿物は、16mlのバッファーAに溶かし、バッファーAに対して、3回透析し、膜抽出液として使用した。

【0083】(2) GST-低分子量Gタンパク質アフィニティー・カラムの調製

Shimizu, K. et al., J. Biol. Chem. 269, 22917-22920 (1994)に記載された方法に従って、GST-Rhodan A、GST-Rhodan A^{A1-37}、GST-Rac1、GST-H-Rasを、大腸菌より精製し、グアニンヌクレオチドを付加した。グアニンヌクレオチド結合型のGST-低分子量Gタンパク質の調製は、低分子量Gタンパク質(1.5nmol)を1時間、4℃で、15μM GDPまたはGTPγSと1ml中の反応液(20mM Tris-HCl (pH7.5), 10mM EDTA, 1mM DTT, 5mM MgCl₂, 1mM L-α-ジミリスチルホスファチジルコリン, 0.3% 3-[(3-コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホネート(CHAPS)中でインキュベートすることにより調製した(Shimizu, K. et al., J. Biol. Chem. 269, 22917-22920 (1994))。Rhodanパク質結合タンパク質の結合活性を分析するためのアフィニティー・カラムを調製するために、GST-低分子量Gタンパク質(各6nmol)を0.25mlのグルタチオン・セファロース4Bカラム(ファルマシア バイオテック社)に固定化し、カラムにバックした。ペプチドの一次構造決定用Rhodanパク質結合性タンパク質を精製するためのアフィニティー・カラムを調製するために、GST-低分子量Gタンパク質(各24nmol)を1mlのグルタチオン・セファロース4Bカラム(ファルマシア バイオテック社)に固

定化し、カラムにバックした。

【0084】(3) GST-低分子量Gタンパク質アフィニティー・カラム・クロマトグラフィー

膜抽出液は、2.5mlのグルタチオン・セファロース4Bカラムに通して、内在性のGSTを取り除いた。10分の1のカラム素通り画分を、それぞれのグアニンヌクレオチドを付加したGST-低分子量Gタンパク質を結合した、0.25mlのグルタチオン・セファロース4Bカラムにのせた。0.2MのNaClを含む0.825mlのバッファーAで3回洗浄した後、結合していた蛋白質をそれぞれのGST-低分子量Gタンパク質と一緒に、10mM グルタチオンを含む0.825mlのバッファーAで溶出した。グルタチオン溶出画分の各40μlをSDS-PAGE (Laemmli, U.K., Nature 227, 680-685 (1970)) にかけて、ゲルを銀染色をして解析した。結果は図1に示される通りであった。

【0085】その結果、分子量約138kDaのタンパク質(p138タンパク質)が、分子量約164kDaおよび分子量約128kDaのタンパク質とともに、GTPγS・GST-RhoAアフィニティー・カラムからの溶出画分に検出されたが(レーン3)、GDP・GST-RhoAアフィニティー・カラムからの溶出画分には検出されなかった。このことより、p138タンパク質はGTPγS結合型のGST-RhoAに特異的に結合することが示された。p138タンパク質は、エフェクター領域の突然変異体(GTPγS・GST-RhoA^{A1A37})(レーン4)、GTPγS・GST-H-Ras(レーン6)、GDP・GST-H-Ras(レーン5)アフィニティー・カラムからは溶出されなかった。

【0086】(4) p138タンパク質の精製

p138タンパク質を同定するために、下記に記載のとおり、精製p138タンパク質の大量調製を行いペプチドの一次構造を決定した。グルタチオン・セファロース4Bカラムからの素通り画分(16ml)を、24nmolのGTPγS・GST-RhoAを付加した1mlのグルタチオン・セファロースカラムに通した。蛋白質は、10mM グルタチオンと0.2M NaClとを含む10mlのバッファーAで溶出し、画分を1mlずつ集めた。p138タンパク質は、画分2-10に見られた。同一の操作を3回繰り返した。これらの画分を全て集めてp138タンパク質精製標品とした。

【0087】(5) p164の精製

p164を精製するために、GTPγS・GST-RhoAを含むグルタチオン・セファロースアフィニティーカラムからの溶出画分(画分3-10)を同量のバッファーAで希釈し、バッファーAで平衡化したMono Q 5/5 カラムにロードした。カラムを10mlのバッファーAで洗浄後、タンパク質を、0-0.5MのNaCl溶液の直線密度勾配に調整したバッファーAで

溶出し、溶出画分を0.5mlずつ回収した。結果は図2に示される通りであった。p164は、画分10-12にシングルピークとして回収された(図2上段)。溶出画分(8-14)の一部を、SDS-PAGE電気泳動を行い、銀染色したところ、精製サンプルの純度は約95%であった(図2下段)。

【0088】実施例2 p138タンパク質の同定

(1) ペプチドの一次構造の決定

p138タンパク質を同定するために、アミノ酸配列分析を実施した。p138タンパク質精製標品をSDS-PAGEにかけ、ポリビニリデン ジフルオリド膜(プロブロット)(アブライド バイオシステムズ社)にトランスファーした。p138タンパク質に相当するバンドを、リジン特異的エンドヌクレアーゼであるアクロモバクタープロテアーゼI(和光純薬工業(株))により消化した(Iwamatsu, A., Electrophoresis 13, 142-147 (1992))。生じたペプチドを、C18カラム・クロマトグラフィーにより分画し、アミノ酸配列分析にかけ、同定した。その結果、9種のp138タンパク質由来のペプチドの一次構造が決定した。それらは、1) RWIGSE、2) SLLQM、3) GYTEVL、4) ETLIIIEPEK、5) DESPA、6) AYVAPTV、7) SLQGI、8) AQLHDTNML、9) DENGALIRVISであった。これらの9種のペプチド配列は全て、ラット平滑筋タンパク質フォスファターゼ1Mの110kDa調節サブユニット(前掲Chen, Y.H. et al.)の配列(配列番号1)の部分配列とほぼ一致した。このラットタンパク質はニワトリのミオシン軽鎖フォスファターゼのミオシン結合サブユニットのラットのカウンターパートである(前掲Shimizu, H. et al.)上記のタンパク質の相同性検索には、BLASTプログラムを用いた(Altschul, S.F. et al., J. Mol. Biol. 215, 403-410(1990))。

【0089】(2) イムノブロット解析

p138タンパク質がミオシン軽鎖フォスファターゼのミオシン結合サブユニットに相当することをさらに確認するために、抗ミオシン結合サブユニット抗体を用いたイムノブロット解析を実施した。ニワトリ由来の130kDaミオシン結合サブユニットに対するウサギポリクローナル抗体および20kDaの調節サブユニットに対するウサギポリクローナル抗体は、常法に従って、それぞれの組換え型蛋白質を調製し、これを抗原として用いて作製した。37kDaタイプ1フォスファターゼ触媒サブユニットに対するウサギポリクローナル抗体は、サンタ・クルーズ・バイオテクノロジー社により購入した。イムノブロット解析は、Harlow, E. & Lane, D., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1988に記載された方法に従って実施した。結果は図3に示される通りであった。

【0090】その結果、p138タンパク質は、上記の

抗ミオシン結合サブユニット抗体によって認識され、免疫交差反応が、GTP γ S・GST-Rh α Aアフィニティー・カラムからのグルタチオン溶出画分(レーン3)に検出されたが、GDP・GST-Rh α A(レーン2)、GTP γ S・GST-Rh α A^{A1A37}(レーン4)、GDP・GST-Rac1(レーン5)、GTP γ S・GST-Rac1(レーン6)、GDP・GST-H-Ras(レーン7)、GTP γ S・GST-H-Rasアフィニティー・カラムからの溶出画分(レーン8)には、いずれも検出されなかった。尚、イムノプロット解析に用いたグルタチオン溶出画分は各40 μ lであった。

【0091】ニワトリおよびラットのミオシン結合サブユニットの分子量はSDS-PAGEで、約130kDaと推定されている(前掲Shimizu, H. et al., Chen, Y.H. et al.)。従って、p138タンパク質は、ミオシン結合サブユニットのウシのカウンターパートであると結論された。ミオシン軽鎖フォスファターゼは、ミオシン結合サブユニット、37kDaタイプ1フォスファターゼ触媒サブユニットおよび20kDa調節サブユニットから構成されている(前掲Shimizu, H. et al., Chen, Y.H. et al.)。そこで、触媒サブユニットがGTP γ S・GST-Rh α Aアフィニティー・カラムに結合しているかどうかについて、抗触媒サブユニット抗体を用いたイムノプロット解析により検討した。結果は図4に示される通りであった。

【0092】その結果、免疫交差反応が、GTP γ S・GST-Rh α Aアフィニティー・カラムからの溶出画分に検出されたが(レーン3)、GDP・GST-Rh α A(レーン2)、GTP γ S・GST-Rh α A^{A1A37}(レーン4)、GDP・GST-Rac1(レーン5)、GTP γ S・GST-Rac1(レーン6)、GDP・GST-H-Ras(レーン7)、GTP γ S・GST-H-Rasアフィニティー・カラムからの溶出画分(レーン8)には、いずれも検出されなかった。一方、20kDa調節サブユニットに相当するimmunoreactiveなバンドは検出されなかった(データ省略)。尚、イムノプロット解析に用いたグルタチオン溶出画分は各40 μ lであった。

【0093】(3)タンパク質脱リン酸化酵素活性の測定

次に、ミオシン軽鎖フォスファターゼ活性が、様々な低分子量Gタンパク質アフィニティー・カラムからの溶出画分(各20 μ l)に検出されるかどうかを検討した。ミオシン軽鎖フォスファターゼ活性は、Ishihara, H. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 159, 871-877 (1989)に記載の方法に従って測定した。その結果、ミオシン軽鎖フォスファターゼ活性は、GTP γ S・GST-Rh α Aアフィニティー・カラムからの溶出画分に特異的に検出された(図5)。定量的なイムノプロット

解析の結果、精製標品では、GTP γ S・GST-Rh α Aアフィニティー・カラムに結合するミオシン結合サブユニットと触媒サブユニットのモル比は、約2:1であることが明らかになった(データ省略)。一方、粗抽出液を用いた実験では、約90%のミオシン結合サブユニットがGTP γ S・GST-Rh α Aアフィニティー・カラムに結合するが、約10%の触媒サブユニットしかGTP γ S・GST-Rh α Aアフィニティー・カラムに結合しないことがわかった(データ省略)。このことより、ミオシン軽鎖フォスファターゼのホロ酵素は、ミオシン結合サブユニットを介して活性型Rh α タンパク質に結合することが示された。

【0094】実施例3 インビトロ・トランスレーションにより作製したミオシン結合サブユニットとRh α タンパク質との結合試験

組換えミオシン結合サブユニットがGTP γ S・Rh α Aと結合するかどうかを検討するために、インビトロ・トランスレーションにより組換えミオシン結合サブユニットを調製した。ラットミオシン結合サブユニット(配列番号1に記載のアミノ酸配列の1~976番)を組み込んだプラスミドpCRII(インビトロジェン社)のインビトロ・トランスレーションは、TNT T7を結合した赤芽球ライゼート・システム(プロメガ社)を用いて、プロメガ社の使用説明書に基づいて実施した。インビトロ・トランスレーションにより得たタンパク質は、SDS-PAGEにかけて分析した結果、天然の精製ラットミオシン結合サブユニットと同様の移動度を示した(データ省略)。

【0095】GST-低分子量Gタンパク質(各0.75nmol)を31 μ lのグルタチオン・セファロース4Bビーズに固定化し、310 μ l(10倍量)のバッファーAで洗浄した。固定化ビーズに40 μ lのインビトロ・トランスレーション用反応液を加え、緩やかに混合しながら1時間、4℃でインキュベートした。その後、ビーズを3回、102 μ l(3.3倍量)のバッファーAで洗浄し、102 μ l(3.3倍量)の10mMグルタチオンを含むバッファーAを添加することにより、結合したタンパク質をGST-低分子量Gタンパク質とともに溶出した。溶出物各40 μ lをSDS-PAGEにかけ、真空乾燥後オートラジオグラフィーによって分析した。

【0096】その結果、インビトロ・トランスレーションにより作製した上記ミオシン結合サブユニットは、GTP γ S・GST-Rh α A(レーン3)とともに大量に溶出されたが、GST(レーン1)、GDP・GST-Rh α A(レーン2)またはGTP γ S・GST-Rh α A^{A1A37}(レーン4)とともに比較的小量しか溶出されなかった(図6)。このことより、ミオシン結合サブユニットが活性型Rh α と結合することが確認された。

【0097】実施例4 Rh o タンパク質GTPase 活性試験

p122 Rh o GAPにより刺激されるRh o タンパク質のGTPase活性におけるミオシン軽鎖サブユニットの作用について、下記に記載の方法により検討した。Rh o タンパク質がミオシン結合サブユニットに直接作用するかどうかを確認するため、ラットミオシン結合サブユニットのN末端領域（配列番号1に記載のアミノ酸配列の1～707番）とC末端領域（同699～976番）を、常法に従いマルトース結合タンパク質との融合タンパク質として遺伝子工学的に大腸菌に発現させ、組換えタンパク質（それぞれ、「MBP-N」、「MBP-C」とする）を調製した。

【0098】このために使用したプラスミドは下記の方法で作製した。まず、ラットミオシン結合サブユニットのN末端分とC末端部分を含むプラスミドpMAL-c2は、以下の方法で作製した。N末端の上記1～707番のアミノ酸を含む、2.1キロ塩基対のcDNA断片を、5' ATTAGGATCCATGAAGATGCC GGACGCG3' と5' AATTGGATCCGTA TGTCTCTGGAATACTTTTGCTT3' をプライマーとして用いて、ラット脳クイッククロンcDNA（クロンテック社）をPCR法で増幅して得た。C末端の上記699～976番のアミノ酸を含む840塩基対のcDNA断片は、ラットミオシン結合サブユニットcDNAクローンを、5' ATATGGATCCAA GCAAAAGTATTCCAGAACATAC3' と5' ATTTGGATCCCTACTTGGAAAGT TTGCTTATAAC3' のプライマーを用いて、PCR法で増幅して得た。cDNA断片は、BamHI部位で、pMAL-c2に組み込んだ。

【0099】Rh o Aタンパク質GTPase活性試験は、Homma, Y. & Emori, Y., EMBOJ. 14, 286-291 (1995) に記載の方法に従って実施した。Rh o Aタンパク質のGTPase活性は、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{GTP} \cdot \text{GS T-Rh o A}$ の放射活性の減少を測定することにより調べた。この際に用いた $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{GTP}$ は、アマシヤム社より購入した。 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{GTP} \cdot \text{GS T-Rh o A}$ (10 pmol) を、種々の量のMBP、MBP-N、またはMBP-CとGST-p122 Rh o GAP (5 pmol) の存在下、非存在下で100 μ lの反応液 (20 mM Tris/HCl (pH 7.5), 10 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 mM MgCl_2 , 1 mM GTP, 0.075% CHAPS) 中で、25℃、2分間処理した。反応を3 mlの氷冷停止バッファー (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 25 mM MgCl_2) を加えて停止し、ニトロセルロースフィルター上にのせた。フィルターは、同じ氷冷停止バッファーで3回洗浄した後、結合している放射能活性を、シンチレー

ションカウンターを用いて測定した。結果は図7に示される通りであった。

【0100】その結果、Rh o タンパク質が触媒する $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{GTP}$ の加水分解率は、MBP-N、MBP-Cによって影響を受けなかった。これとは対照的に、p122 Rh o GAPがRh o タンパク質のGTPase活性を刺激する能力は、MBP-N、MBP-Cによって、濃度依存的に抑制されることがわかった。このことより、Rh o タンパク質はミオシン結合サブユニットのN末端とC末端の両方に結合しうることが示唆された。MBP-NおよびMBP-CはGAP-刺激によるRh o タンパク質GTPase活性を、それぞれ約100 nMおよび約150 nMの IC_{50} で抑制した (図7)。

【0101】実施例5 p164によるラット・ミオシン結合サブユニットリン酸化試験

p164のリン酸化活性を調べるために、以下の実験を行なった。キナーゼ活性試験は、精製したp164 (10 ngタンパク質量) を用いて、2 μ M $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ATP}$ (600-800 MBq/mmol) を含む50 μ lのキナーゼバッファー (50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl_2 , 0.06% CHAPS) 中で、基質 (ミオシン結合サブユニット、S6ペプチド、または下記の記載の細胞骨格制御タンパク質、各40 μ M) の存在下または非存在下で行った。30℃で10分間インキュベート後、反応溶液をSDSサンプルバッファー中で煮沸して、SDS-PAGE電気泳動に供した。放射能標識されたバンドは、オートラジオグラフィーにより検出した。反応溶液は、キナーゼ活性試験をするためにワットマンp81ペーパーにスポットした。 ^{32}P の基質への取り込みは、シンチレーションカウンターで計測した。結果は以下に示される通りであった。尚、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ATP}$ は、Amersham社から購入した。

【0102】(1) ラット・ミオシン結合サブユニットを基質として用いた試験
Rh o タンパク質は細胞骨格の再編成に関係していると考えられているので、p164による細胞骨格制御タンパク質であるビンキュリン (vinculin)、タリン (talin)、メタビンキュリン (metavinculin)、カルデスモン (caldesmon)、フィラミン (filamin)、ビメンチン (vimentin)、 α -アクチニン (E. A. Clark & J.S. Brugge, Science, 268, 233-239 (1995))、MAP-4 (H. Aizawa et al., J. Biol. Chem., 265, 13849-13855 (1990))、ミオシンフォスファターゼのミオシン結合サブユニット (Y. H. Chen et al., FEBS Lett., 356, 51-55 (1994)) のリン酸化について、上記の条件に準じて検討した。ただし、ミオシンフォスファターゼのミオシン結合サブユニットについては、ラットのミオシン結合サブ

ユニットのC末端（配列番号1のアミノ酸配列の699～976番）とマルトース結合タンパク質との融合タンパク質（実施例4参照）を用いた。その結果、p164はGST-Rh o A非存在下またはGDP・GST存在下で、これらの基質をリン酸化した。ビンキュリン、タリン、メタビンキュリン、カルデスモン、フィラミン、ビメンチン、 α -アクトニンまたはMAP-4を基質として用いた場合には、GTP γ S・Rh o A存在下でのリン酸化の亢進の程度は低かった（データ省略）。しかしながら、ミオシン結合サブユニット（50 nM）を基質として用いると、GTP γ S・GST-Rh o A存在下で、リン酸化の程度は著しく亢進した（図8）。GTP γ S・GST-Rh o Aによるミオシンサブユニットのリン酸化の亢進の程度は、他のタンパク質を基質として用いた場合と比較して、約15倍であった。なお、用いたGST-Rh o Aの濃度は各1 μ Mであった。

【0103】（2）Rh o Aタンパク質の翻訳後修飾の影響

H. Horiuchi et al., Mol. Cell. Biol., 12, 4515-4520 (1992) およびT. Itoh, et al., J. Biol. Chem., 268, 3025-3028 (1993)に記載の方法に準じて、翻訳後修飾されたRh o Aタンパク質を作製した。これを用いて、前述の方法に従って、p164キナーゼ活性への影響を調べた。結果は図9に示される通りであった。翻訳後修飾されたGTP γ S結合型Rh o Aタンパク質は、非修飾型よりもS6ペプチドのリン酸化を亢進した。

【0104】実施例6 酵母ツー・ハイブリッド・システムによるRh oタンパク質とミオシン結合サブユニットとの結合の測定

A. B. Vojtek et al. cell 74, 205-214 (1993)に記載の方法に準じて、野生型H-Ras、およびC末端のCys-A-A-Leu構造を除去した構成的に活性化された変異型Rh o A^{V8114}のcDNA断片をpBTM116ベクター（前掲A. B. Vojtek et al.）中に導入することにより、これらとLexAを融合タンパク質として酵母細胞中で発現させるためのベクター（それぞれ、pBTM116-RasWT、pBTM116-Rh o A^{V8114}とする）を構築し、これらを用いて酵母（L40株）を形質転換した。また、配列番号1に記載のアミノ酸配列の1～707番の配列（MBS-N）および699～976番の配列（MBS-C）のcDNAをpACTベクター（クロンテック社製、MATCHMAKERライブラリーキット）のBamHI部位中に導入することにより、これらとGAL4を融合タンパク質として酵母細胞中で発現させるためのベクター（それぞれ、pACT11HK-MBS-N、pACT11HK-MBS-Cとする）を構築した。これらのベクターを用いて、pBTM116-RasWT、pBTM116-Rh o A^{V8114}で形質転換した酵母を形質転換した。それぞ

れの形質転換体はヒスチジン要求性で選択した(A. B. Vojtek et al. Cell 74, 205-214 (1993))。その結果、図10に示したようにMBS-Cは変異型Rh o A^{V8114}と結合するが、MBS-Nと変異型Rh o A^{V8114}との結合はこれより弱いことがわかった。

【0105】実施例7 p164によるニワトリ・ミオシン結合サブユニットのリン酸化とこれによるミオシン軽鎖フォスファターゼ活性の抑制

- (1) p164によるニワトリ・ミオシン結合サブユニットリン酸化試験
- p164はニワトリのミオシン結合サブユニットを用いた場合でも、これをリン酸化した。ニワトリのミオシン結合サブユニット (Shimizu, H. et al., J. Biol. Chem., 269, 30407-30411 (1994)) のC末端側のペプチド断片（アミノ酸753～1004）とマルトース結合タンパク質との融合タンパク質（MBS-C）を実施例2（3）に記載の方法に準じて作製し、これを基質として用いて、実施例2（3）に記載の方法に準じてp164によるリン酸化の程度を測定した（図11）。その結果、p164によるMBS-Cのリン酸化の程度は、コントロール（GST存在下、レーン1）に比べ、GTP γ S・GST-Rh o A存在下で5倍以上亢進した（レーン3）。対照的に、GDP・GST-Rh o A（レーン2）、GTP γ S・GST-Rh o A^{A1+37}（レーン4）、GDP・GST-Rac1（レーン5）、GTP γ S・GST-Rac1（レーン6）ではリン酸化の亢進は認められなかった。また、ニワトリのミオシン結合サブユニット (Shimizu, H. et al., J. Biol. Chem., 269, 30407-30411 (1994)) のN末端側のペプチド断片（アミノ酸1～721）を、MBS-Cのかわりに基質として用いた場合は、p164はこれをリン酸化しなかった（データ省略）。

- (2) p164によるニワトリ・ミオシン軽鎖フォスファターゼ活性の抑制
- ニワトリ砂囊からの天然のミオシン軽鎖フォスファターゼの精製は、Shimizu, H. et al., J. Biol. Chem., 269, 30407-30411 (1994)に記載の方法に従って実施した。様々な濃度の天然ウシ脳由来のp164存在下で、ミオシン軽鎖フォスファターゼのリン酸化を測定した（実験1）。また、様々な濃度のp164存在下でリン酸化したミオシン軽鎖フォスファターゼの酵素活性を測定した（実験2）。その結果、p164の濃度依存的に、ミオシン軽鎖フォスファターゼ中のミオシン結合サブユニットがリン酸化されること、およびp164によるリン酸化により、ミオシン軽鎖フォスファターゼの酵素活性が抑制されることが明かとなった。図12は、以上の独立した2つの実験（実験1および実験2）の結果を合わせて、p164の濃度を横軸に取って示したものである。尚、実験1および実験2の具体的な方法は下記に示したとおりである。

【0107】p164による天然のミオシン軽鎖フォスファターゼのリン酸化(実験1)は、種々の量のp164存在下、1 μ MのGTP γ S・GST-RhoA存在下または非存在下で、精製したミオシン軽鎖フォスファターゼ(1.0 μ gタンパク量)を含む40 μ lのパッファー(34mM Tris/HCl, pH 7.5, 34mM KCl, 4.0mM MgCl₂, 1.625mM EDTA, 1.2mM DTT, 1.3% シュクロース, 0.38% CHAPS, 10 μ M [³⁵S] ATP γ S) 中で行なった。3分間インキュベート後、反応混合液をSDS-PAGE電気泳動を行なった後、ミオシン結合サブユニットの被リン酸化の程度をオートラジオグラフィー(Fuji BAS-2000)により測定した。ミオシン軽鎖フォスファターゼ活性に及ぼすリン酸化の影響(実験2)を調べるために、上記と同様の方法により精製したミオシン軽鎖フォスファターゼ(1.0 μ gタンパク量)を、放射能で標識しない10 μ M ATP γ Sの存在下または非存在下、1 μ MのGTP γ S・GST-RhoA存在下または非存在下で、種々の濃度のp164によりリン酸化した。反応は5 μ lの46mM EDTAを加えて停止した。次に5 μ lの放射標識したミオシン軽鎖を含む30mM Tris/HCl, pH 7.5, 30mM KCl, 0.5mM DTTを加えて、トータル50 μ lの反応混合液(5 μ M 32P-ミオシン軽鎖を含む)として反応を開始した。反応は30℃にて6分間行なった。反応を停止した後、ミオシン軽鎖に結合した³²Pの量をIshihara, H. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 159, 871-877 (1989)に記載の方法により測定した。結果は、図12に示すように、p164濃度依存的に³⁵S-チオリン酸がミオシン軽鎖フォスファターゼに取り込まれた。一方、ATP γ S存在下では、p164濃度依存的にミオシン軽鎖フォスファターゼ活性の抑制が見出されたが、この抑制はATP γ S非存在下では見られなかった。以上の結果より、p164によりリン酸化を受けると、ミオシン軽鎖フォスファターゼの酵素活性が抑制されることが明かとなった。

【0108】実施例8 NIH/3T3細胞内でのRhoによるミオシン結合サブユニットおよびミオシン軽鎖のリン酸化の亢進の測定

下記に記載する様に、NIH/3T3細胞内で、Rhoによってミオシン結合サブユニットのリン酸化が亢進するかどうかについて検討した。製造企業(Stratagene社)の使用説明書に基づき、NIH/3T3細胞に、p3'SSおよびpOPRSVI-HA-RhoAまたはpOPRSVI-HA-RhoA^{V¹¹⁴}を安定的にトランスフェクションした。これらのプラスミドはIPTG制御下にヘマグルチニン(HA)-RhoAまたはHA-RhoA^{V¹¹⁴}を発現させることができる。

35mmディッシュ中で培養しコンフルエント(conflu

ent)に達したNIH/3T3細胞株(親株、NIH/3T3-RhoA-5、NIH/3T3-RhoA-24、NIH/3T3-RhoA^{V¹¹⁴}-7およびNIH/3T3-RhoA^{V¹¹⁴}-24)を5mM IPTGで24時間処理した。最後の12時間は、血清を除去した培養液中で培養し、その後、9.25 MBqの[³²P]-オルトリン酸で2時間標識した。その後、³²Pで標識した細胞を溶解し、ミオシン結合サブユニットを免疫沈降させた。洗浄した免疫沈降物をSDS-PAGEにかけ、オートラジオグラフィーした。上記の方法で、RhoAまたはRhoA^{V¹¹⁴}をNIH/3T3細胞中に過剰に発現させたところ、過去に記載(A. J. Ridley & A. Hall, Cell 70, 389-399 (1992)およびA. J. Ridley & A. Hall, EMBO J., 13, 2600-2610 (1994))のごとく、高いレベルのストレス・ファクターおよびフォーカル・コンタクト形成が観察された。ミオシン結合サブユニットの量は、親株を含む全てのNIH/3T3細胞株でほぼ同程度だった(データ省略)が、RhoAまたはRhoA^{V¹¹⁴}を過剰に発現させたNIH/3T3細胞内のミオシン結合サブユニットのリン酸化の程度は、親株のNIH/3T3細胞内のミオシン結合サブユニットのリン酸化の程度に比べて顕著に高かった(図13)。次に、親株およびRhoAまたはRhoA^{V¹¹⁴}を過剰に発現させたNIH/3T3細胞内のミオシン軽鎖のリン酸化の程度を、下記に記載の方法に従って測定した。IPTG処理および血清除去操作を100mmディッシュ中で行ったNIH/3T3細胞株に10% TCAを添加した。ミオシン軽鎖のリン酸化の程度を決定するために、トリクロロ酢酸(TCA)沈降物をグリセロール・ウレア・ゲル電気泳動にかけ、リン酸化された(monophosphorylated (MLCP) and diphosphorylated (MLCP₂))ミオシン軽鎖とリン酸化されていないミオシン軽鎖の相対的な量を、イムノ・プロット法(D. A. Taylor & J. T. Stull, J. Biol. Chem. 263, 14456 (1988))により定量した。この際、細胞を、0.1 μ Mのフォスファターゼ阻害剤(calyculin-A (CLA))で10分間処理したところ、ミオシン軽鎖のリン酸化の程度は上昇した(図14)。RhoAまたはRhoA^{V¹¹⁴}を過剰に発現させたNIH/3T3細胞内のミオシン軽鎖のリン酸化の程度は、親株のNIH/3T3細胞内のミオシン軽鎖のリン酸化の程度に比べて明かに高かった(図14)。異なる3株のRhoAまたはRhoA^{V¹¹⁴}を過剰に発現させたNIH/3T3細胞を用いて、本質的に同一の結果が得られた。以下の理論に拘束される訳ではないが、以上の結果は、発現誘導させたRhoAまたは、RhoA^{V¹¹⁴}により、NIH/3T3細胞内に内因性に存在するp164タンパク質が、活性化された結果、ミオシン結合サブユニットのリン酸化が亢進し、ミオシン軽鎖フォスファターゼ活性が阻害され、これによ

って、ミオシン軽鎖の脱リン酸化が抑制されたと解釈される。

【0109】実施例9 ミオシン結合サブユニットの細胞内分布における活性型Rhoの効果

COS-7細胞にミオシン結合サブユニット(MBS)を発現させた際のミオシン結合サブユニットの細胞内分布について検討した。具体的には下記の方法に従って実験を実施した。

【0110】Mycエピトープ・タグを融合させたMBS(Myc-MBS)を発現させるために、ラットMBSをpEF-BOS-Myc(Mizushima, S. & Nagata, S., Nucleic. Acids Res., 18, 5322 (1990))中にクローニングし、pEF-BOS-Myc-MBSを得た。また、ヘマトアグルチニン(HA)・タグを融合させたHA-RhoAおよびHA-RhoA

^{V¹¹⁴}(Mukai, H. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 204, 348-356 (1994))を発現させるために、pEF-BOS-HA-RhoAおよびpEF-BOS-HA-RhoA^{V¹¹⁴}を得た。pEF-BOS-Myc中のMycをHAに置換したpEF-BOS-HA中にクローニングし、プラスミドpEF-BOS-Myc-MBSおよびpEF-BOS-HA-RhoAまたはpEF-BOS-HA-RhoA^{V¹¹⁴}を、Ridley, A. et al., Cell 70, 401-410 (1992)に記載の方法に従って、COS-7細胞にトランスフェクションした。40時間後、細胞を回収し、細胞溶解用バッファー(20mM Tris-HCl (pH 7.5), 1mM EDTA, 5mM MgCl₂, 10mM ピロリン酸ナトリウム, 2.5μg/ml ロイペプチン, 0.15M NaCl)に懸濁し、Dounceホモジェナイザーによってホモジェナイズした。核と細胞の残骸を、4000×gで5分間遠心分離することによって沈殿させた。上清を100,000×gで30分間遠心分離することによって、サイトゾル画分および膜(particulate)画分を得た。サイトゾル画分および膜画分をそれぞれ、Myc-エピトープに対する抗体(9E10)を用いたイムノブロット解析にかけた。

【0111】結果は図15に示される通りであった。即ち、約40%のミオシン結合サブユニット(Myc-MBS)がサイトゾル画分に、残りの60%が膜画分に存在することがわかった。細胞をRhoAとともにトランスフェクションしたところ、サイトゾル画分に存在するミオシン結合サブユニットが減少するとともに、膜画分に存在するミオシン結合サブユニットが増加した。HA-RhoAに比べてRhoA^{V¹¹⁴}ではよりこの効果が高かった。以上のことから、RhoAは、ミオシン結合サブユニットの膜への分布を促進すること、そしてRhoAのこの作用は、RhoAがミオシン結合サブユニットと複合体を形成することによって現れると考えられる。

【0112】実施例10 ヒトミオシン結合サブユニットをコードするcDNAのクローニング

(1) ヒトミオシン結合サブユニットをコードするcDNAのクローニング

ヒトミオシン結合サブユニット(MBS)をコードするcDNAをクローニングするために、まず、ニワトリ砂嚢由来のMBS cDNAの部分断片Z3 (Shimizu et al., J. Biol. Chem. 269, 30407-30411 (1994) に記載がある) をプローブとして、ラット肺動脈λ Uni-ZAP XR cDNAライブラリー(Stratagene 社)をスクリーニングし、ラットの肺由来MBSの部分cDNA(塩基配列2364~3364の領域)を得た。これをプローブとして、ヒト肺 Uni-ZAP XR cDNAライブラリー(Stratagene 社)をスクリーニングした。その結果、ヒト肺由来のMBS cDNAの部分配列(配列番号4に記載の塩基配列495~2112)が得られた。このヒト肺由来部分cDNAをプローブとして、ヒト脳λgt10 cDNAライブラリー(CLONTECH社)(1.0×10⁶ プラーク)をスクリーニングした。上記スクリーニングは、J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) に準じて行った。その結果、NおよびC末端の約1kbpをカバーする2つのクローン(それぞれ配列番号4に記載の塩基配列1~653および塩基配列1941~3102をコードする)が得られた。ヒトMBS cDNAの中央部分(配列番号4に記載の塩基配列623~2014)は、Human Brain QUICK-CloneTM cDNA(CLONTECH社)を鋳型として、プライマー(5' CTG GAG GTA CAG CAC TTCACG TTG CAG CTG 3' および 5' TTT GGG ATT CAG ACT CTT CAT CCC TAA CAG 3')を使用してTAKARA LA-PCR kit(宝酒造社)を用いてPCRを行い増幅した。ヒトMBS cDNAのオープン・リーディング・フレームをカバーするこれら3つのクローンは、pBluscriptII SK(-)(M.A. Altling-Mees et al., Nucleic Acids Res., 17, 9494 (1989)) (Stratagene社)中にクローン化した。塩基配列決定のため、Pharmacia 社製double-stranded Nested Deletion Kitを使用してdeletion mutantを作製し、ABI社の377 DNAシーケンサーを使って配列を決定した。

【0113】(2) 配列分析

全長のヒトMBS cDNAの塩基配列およびこれより推定されるアミノ酸配列は、それぞれ配列番号4および配列番号3に記載した通りであった。ヒト脳由来のMBS cDNAの配列は、決定されたヒト肺由来のMBSの部分cDNA配列と完全に一致した。ヒトMBSの推定アミノ酸配列は1030アミノ酸残基からなり、推定分子量は、約115kDaであった。ヒトMBSのアミノ酸配列は、ラット(配列番号1)およびニワトリ(Shimizu, H. et al., J. Biol. Chem. 269, 30407-30411 (1994))のものと同様に、N末側にアンキリン リピー

ト、C末側にロイシン ジッパー様ドメインが存在した。ヒトMBSのアンキリンリピート（配列番号3に記載のアミノ酸配列39～295）は、ラットMBSのアンキリン リピート（配列番号1に記載のアミノ酸配列39～253）と99%、ニワトリMBSのアンキリン リピート（アミノ酸配列39～295）（Shimizu, H. et al., J. Biol. Chem. 269, 30407-30411 (1994)）と96%の同一性を示した。そして、全長のヒトMBSのアミノ酸配列（配列番号3に記載のアミノ酸配列1～1030）は、ラットのそれ（配列番号1に記載のアミノ酸配列1～976）と89%、ニワトリそれ（アミノ酸配列1～963）（Shimizu, H. et al., J. Biol. Chem. 269, 30407-30411 (1994)）と81%の同一性を示した。

【0114】実施例11 ツーハイブリッド法をもちいたヒトMBSと活性型Rh oタンパク質との結合の検出
ヒトMBSのアミノ酸配列754～1030に相当するcDNA断片を、配列番号4に記載のcDNAを鋳型とし、5'-CTAGCGGCCGCAATTTTGGAAGTTTGCTTATTACTCTGATC-3'、および5'-AAAGCGGCCGCTATATAAACAAGTACTCCAGAAC-3'をプライマーとしたPCRによって増幅し、プラスミドpVP16（Vojtek, A.B. et. al. Cell, 74, 205-214 (1993)）のNot I部位に挿入し、VP16-MBS融合タンパク質の酵母発現用ベクター（pVP16-hMBS）を作製した。またVojtek, A.B. et. al. Cell, 74, 205-214 (1993)に準じて、プラスミドpBT116（Vojtek, A.B. et. al. Cell, 74, 205-214 (1993)）に低分子量Gタンパク質（野生型H-Ras、活性型H-Ras^{Va112}、野生型Rh o、および活性型Rh o^{Va114}）のcDNAを挿入することにより、LexA-野生型H-Ras融合タンパク質、LexA-活性型H-Ras^{Va112}融合タンパク質、LexA-野生型Rh o融合タンパク質、LexA-活性型Rh o^{Va114}融合タンパク質の酵母発現用ベクターを作製した。LiCl法（Ito, H. et. al. J. Bacteriol., 153, 163-168 (198

配列

Met	Lys	Met	Ala	Asp	Ala	Lys	Gln	Lys	Arg	Asn	Glu	Gln	Leu	Lys	Arg
1					5					10				15	
Trp	Ile	Gly	Ser	Glu	Thr	Asp	Leu	Glu	Pro	Pro	Val	Val	Lys	Arg	Gln
				20				25					30		
Lys	Thr	Lys	Val	Lys	Phe	Asp	Asp	Gly	Ala	Val	Phe	Leu	Ala	Ala	Cys
			35				40					45			
Ser	Ser	Gly	Asp	Thr	Asp	Glu	Val	Leu	Lys	Leu	Leu	His	Arg	Gly	Ala
		50			55					60					
Asp	Ile	Asn	Tyr	Ala	Asn	Val	Asp	Gly	Leu	Thr	Ala	Leu	His	Gln	Ala
	65			70				75					80		
Cys	Ile	Asp	Asp	Asn	Val	Asp	Met	Val	Lys	Phe	Leu	Val	Glu	Asn	Gly
				85			50	90					95		

*3)) により、pVP16-hMBSとそれぞれのpBTM116-低分子量Gタンパク質を酵母（*S. cerevisiae*）のL40株（Mat a trp1 leu2 his3 ade2 LYS2:: (LexAop)4-HIS3 URA3:: (LexAop)8-LacZ）に導入し、VP16-MBS融合タンパク質とLexA-野生型H-Ras融合タンパク質、LexA-活性型H-Ras^{Va112}融合タンパク質、LexA-野生型Rh o融合タンパク質、またはLexA-活性型Rh o^{Va114}融合タンパク質を発現させた。選択培地（ロイシン、トリプトファン、ヒスチジンを含まない）上で培養し、ヒスチジン要求性を検討した。その結果、活性型Rh o^{Va114}とVP16-MBS融合タンパク質を共発現している株でのみ、選択培地上で生存した（データ省略）。このことから、ヒトのミオシン結合サブユニットのC末端側（配列番号3に記載のアミノ酸配列754～1030）は、ラットのミオシン結合サブユニットのC末端側（実施例6）と同様に、活性型Rh oに特異的に結合することがわかった。また、ヒトのミオシン結合サブユニットのRh o結合領域（配列番号3に記載のアミノ酸配列754～1030）は、ラットのミオシン結合サブユニットの相当する領域（配列番号1に記載のアミノ酸配列699～976）またはニワトリのミオシン結合サブユニットの相当する領域（前掲Shimizu, H. et al. (1994)）に記載のアミノ酸配列711～963）と、それぞれ92%および74%の同一性を有していた。

【0116】

【配列表】

配列番号：1

30 配列の長さ：976

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源：

生物名：ラット

37

38

Ala Asn Ile Asn Gln Pro Asp AsnGlu Gly Trp Ile Pro Leu His Ala
 100 105 110
 Ala Ala Ser Cys Gly Tyr Leu Asp Ile Ala Glu Phe Leu Ile Gly Gln
 115 120 125
 Gly Ala His Val Gly Ala Val Asn Ser Glu Gly Asp Thr Pro Leu Asp
 130 135 140
 Ile Ala Glu Glu Glu Ala Met Glu Glu Leu Leu Gln Asn Glu Val Asn
 145 150 155 160
 Arg Gln Gly Val Asp Ile Glu Ala Ala Arg Lys Glu Glu Glu Arg Ile
 165 170 175
 Met Leu Arg Asp Ala Arg Gln Trp Leu Asn Ser Gly His Ile Ser Asp
 180 185 190
 Val Arg His Ala Lys Ser Gly Gly Thr Ala Leu His Val Ala Ala Ala
 195 200 205
 Lys Gly Tyr Thr Glu Val Leu Lys Leu Leu Ile Gln Ala Gly Tyr Asp
 210 215 220
 Val Asn Ile Lys Asp Tyr Asp Gly Trp Thr Pro Leu His Ala Ala Ala
 225 230 235 240
 His Trp Gly Lys Glu Glu Ala Cys Arg Ile Leu Val Asp Asn Leu Cys
 245 250 255
 Asp Met Glu Thr Val Asn Lys Val Gly Gln Thr Ala Phe Asp Val Ala
 260 265 270
 Asp Glu Asp Ile Leu Gly Tyr Leu Glu Glu Leu Gln Lys Lys Gln Asn
 275 280 285
 Leu Leu His Ser Glu Lys Arg Asp Lys Lys Ser Pro Leu Ile Glu Ser
 290 295 300
 Thr Ala Asn Met Glu Asn Asn Gln Pro Gln Lys Thr Phe Lys Asn Lys
 305 310 315 320
 Glu Thr Leu Ile Ile Glu Pro Glu Lys Asn Ala Ser Arg Ile Glu Ser
 325 330 335
 Leu Glu Gln Glu Lys Ala Asp Glu Glu Glu Glu Gly Lys Lys Asp Glu
 340 345 350
 Ser Ser Cys Ser Ser Glu Glu Asp Glu Glu Asp Asp Ser Glu Ser Glu
 355 360 365
 Ala Glu Thr Asp Lys Thr Lys Pro Met Ala Ser Val Thr Asn Ala His
 370 375 380
 Thr Ala Ser Thr Gln Ala Ala Pro Ala Ala Val Thr Thr Pro Thr Leu
 385 390 395 400
 Ser Ser Asn Gln Gly Thr Pro Thr Ser Pro Val Lys Lys Phe Pro Thr
 405 410 415
 Ser Thr Thr Lys Ile Ser Pro Lys Glu Glu Glu Arg Lys Asp Glu Ser
 420 425 430
 Pro Ala Ser Trp Arg Leu Gly Leu Arg Lys Thr Gly Ser Tyr Gly Ala
 435 440 445
 Leu Ala Glu Ile Thr Ala Ser Lys Glu Ala Gln Lys Glu Lys Asp Thr
 450 455 460
 Ala Gly Val Ile Arg Ser Ala Ser Ser Pro Arg Leu Ser Ser Ser Leu
 465 470 475 480
 Asp Asn Lys Glu Lys Glu Lys Asp Asn Lys Gly Thr Arg Leu Ala Tyr
 485 50 490 495

39

40

Val Ala Pro Thr Ile Pro Arg Arg Leu Gly Ser Thr Ser Asp Ile Glu
 500 505 510
 Glu Lys Glu Asn Arg Glu Ser Ser Asn Leu Arg Thr Ser Ser Ser Tyr
 515 520 525
 Thr Arg Arg Lys Trp Glu Asp Asp Leu Lys Lys Asn Ser Ser Ile Asn
 530 535 540
 Glu Gly Ser Thr Tyr His Arg Ser Thr Ser Asn Arg Leu Trp Ala Glu
 545 550 555 560
 Asp Ser Thr Glu Lys Glu Lys Asp Ser Ala Pro Thr Ala Ala Thr Ile
 565 570 575
 Leu Val Ala Pro Thr Val Val Ser Ala Ala Ala Ser Ser Thr Thr Ala
 580 585 590
 Leu Thr Thr Thr Thr Ala Gly Thr Leu Ser Ser Thr Ser Glu Val Arg
 595 600 605
 Glu Arg Arg Arg Ser Tyr Leu Thr Pro Val Arg Asp Glu Glu Ser Glu
 610 615 620
 Ser Gln Arg Lys Ala Arg Ser Arg Gln Ala Arg Gln Ser Arg Arg Ser
 625 630 635 640
 Thr Gln Gly Val Thr Leu Thr Asp Leu Gln Glu Ala Glu Lys Thr Ile
 645 650 655
 Gly Arg Ser Arg Ser Thr Arg Thr Arg Glu Gln Glu Asn Glu Glu Lys
 660 665 670
 Asp Lys Glu Glu Lys Glu Lys Gln Asp Lys Glu Lys Gln Glu Glu Lys
 675 680 685
 Lys Glu Ser Glu Val Ser Arg Glu Asp Glu Tyr Lys Gln Lys Tyr Ser
 690 695 700
 Arg Thr Tyr Asp Glu Thr Tyr Ala Arg Tyr Arg Pro Val Ser Thr Ser
 705 710 715 720
 Ser Ser Ser Thr Pro Ser Ser Ser Ser Leu Ser Thr Leu Gly Ser Ser
 725 730 735
 Leu Tyr Ala Ser Ser Gln Leu Asn Arg Pro Asn Ser Leu Val Gly Ile
 740 745 750
 Thr Ser Ala Tyr Ser Arg Gly Leu Thr Lys Asp Asn Glu Arg Glu Gly
 755 760 765
 Glu Lys Lys Glu Glu Glu Lys Glu Gly Glu Asp Lys Ser Gln Pro Lys
 770 775 780
 Ser Ile Arg Glu Arg Arg Arg Pro Arg Glu Lys Arg Arg Ser Thr Gly
 785 790 795 800
 Val Ser Phe Trp Thr Gln Asp Ser Asp Glu Asn Glu Gln Glu Arg Gln
 Ser Asp Thr Glu Asp Gly Ser Ser Lys Arg Asp Thr Gln Thr Asp Ser
 820 825 830
 Val Ser Arg Tyr Asp Ser Ser Ser Thr Ser Ser Ser Asp Arg Tyr Asp
 835 840 845
 Ser Leu Leu Gly Arg Ser Ala Ser Tyr Ser Tyr Leu Glu Glu Arg Lys
 850 855 860
 Pro Tyr Gly Ser Arg Leu Glu Lys Asp Asp Ser Thr Asp Phe Lys Lys
 865 870 875 880
 Leu Tyr Glu Gln Ile Leu Ala Glu Asn Glu Lys Leu Lys Ala Gln Leu
 885 890 895
 His Asp Thr Asn Met Glu Leu Thr Asp Leu Lys Leu Gln Leu Glu Lys

41

42

900	905	910
Ala Thr Gln Arg Gln Glu Arg Phe Ala Asp Arg Ser Leu Leu Glu Met		
915	920	925
Glu Lys Arg Glu Arg Arg Ala Leu Glu Arg Arg Ile Ser Glu Met Glu		
930	935	940
Glu Glu Leu Lys Met Leu Pro Asp Leu Lys Ala Asp Asn Gln Arg Leu		
945	950	955
Lys Asp Glu Asn Gly Ala Leu Ile Arg Val Ile Ser Lys Leu Ser Lys		
965	970	975

【0117】配列番号：2

配列の長さ：3300

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

* トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源：

* 生物名：ラット

配列

CGGTGCGACA CCCCCCGGTG TCCCTCGCC TCCCTCGCCG CCGCCCCCTT CCCCCGCTCG	60
CGATAAGAAG AGCCGCGCGC AGGAGAGGGG ATG AAG ATG GCG GAC GCG AAG CAG	114
Met Lys Met Ala Asp Ala Lys Gln	
1 5	
AAG CGG AAC GAG CAG CTG AAG CGC TGG ATC GGC TCC GAG ACG GAC CTC	162
Lys Arg Asn Glu Gln Leu Lys Arg Trp Ile Gly Ser Glu Thr Asp Leu	
10 15 20	
GAG CCT CCC GTG GTG AAG CGC CAG AAG ACC AAG GTG AAG TTC GAC GAT	210
Glu Pro Pro Val Val Lys Arg Gln Lys Thr Lys Val Lys Phe Asp Asp	
25 30 35 40	
GGC GCC GTC TTC CTC GCC GCC TGC TCC AGC GGC GAC ACG GAC GAG GTC	258
Gly Ala Val Phe Leu Ala Ala Cys Ser Ser Gly Asp Thr Asp Glu Val	
45 50 55	
CTC AAG CTG CTG CAC CGC GGC GCC GAC ATC AAT TAC GCC AAT GTG GAC	306
Leu Lys Leu Leu His Arg Gly Ala Asp Ile Asn Tyr Ala Asn Val Asp	
60 65 70	
GGA CTC ACC GCC CTG CAC CAG GCT TGC ATT GAT GAC AAT GTT GAT ATG	354
Gly Leu Thr Ala Leu His Gln Ala Cys Ile Asp Asp Asn Val Asp Met	
75 80 85	
GTG AAG TTT CTG GTA GAA AAT GGA GCA AAT ATC AAT CAA CCT GAC AAT	402
Val Lys Phe Leu Val Glu Asn Gly Ala Asn Ile Asn Gln Pro Asp Asn	
90 95 100	
GAA GGC TGG ATT CCA CTC CAT GCA GCC GCT TCC TGT GGA TAT CTG GAT	450
Glu Gly Trp Ile Pro Leu His Ala Ala Ala Ser Cys Gly Tyr Leu Asp	
105 110 115 120	
ATT GCA GAA TTT TTG ATT GGT CAA GGA GCA CAT GTA GGA GCT GTC AAC	498
Ile Ala Glu Phe Leu Ile Gly Gln Gly Ala His Val Gly Ala Val Asn	
125 130 135	
AGT GAA GGT GAC ACA CCT TTA GAT ATT GCA GAG GAG GAA GCA ATG GAA	546
Ser Glu Gly Asp Thr Pro Leu Asp Ile Ala Glu Glu Glu Ala Met Glu	
140 145 150	
GAG CTA CTT CAA AAT GAG GTT AAT CGG CAA GGT GTT GAT ATA GAA GCA	594
Glu Leu Leu Gln Asn Glu Val Asn Arg Gln Gly Val Asp Ile Glu Ala	
155 160 165	
GCT CGA AAA GAA GAG GAA CGC ATA ATG CTT AGA GAC GCG AGG CAG TGG	642
Ala Arg Lys Glu Glu Glu Arg Ile Met Leu Arg Asp Ala Arg Gln Trp	

43	44
170	175
TTG AAC AGT GGT CAC ATC AGT GAC GTC CGG CAT GCA AAG TCC GGA GGC	690
Leu Asn Ser Gly His Ile Ser Asp Val Arg His Ala Lys Ser Gly Gly	
185	190
ACA GCA CTC CAC GTG GCA GCG GCC AAA GGG TAT ACA GAA GTT TTA AAA	738
Thr Ala Leu His Val Ala Ala Ala Lys Gly Tyr Thr Glu Val Leu Lys	
205	210
CTT TTA ATA CAG GCA GGC TAT GAT GTT AAT ATT AAA GAT TAT GAT GGC	786
Leu Leu Ile Gln Ala Gly Tyr Asp Val Asn Ile Lys Asp Tyr Asp Gly	
220	225
TGG ACA CCT CTT CAT GCT GCA GCT CAC TGG GGT AAA GAA GAA GCA TGT	834
Trp Thr Pro Leu His Ala Ala Ala His Trp Gly Lys Glu Glu Ala Cys	
235	240
CGG ATT TTA GTG GAC AAT CTG TGT GAT ATG GAG ACG GTC AAC AAA GTG	882
Arg Ile Leu Val Asp Asn Leu Cys Asp Met Glu Thr Val Asn Lys Val	
250	255
GGC CAA ACA GCC TTT GAT GTA GCA GAT GAA GAC ATT TTG GGA TAT CTA	930
Gly Gln Thr Ala Phe Asp Val Ala Asp Glu Asp Ile Leu Gly Tyr Leu	
265	270
GAG GAG TTG CAA AAA AAA CAA AAT CTG CTC CAT AGT GAA AAG CGG GAT	978
Glu Glu Leu Gln Lys Lys Gln Asn Leu Leu His Ser Glu Lys Arg Asp	
285	290
AAG AAA TCT CCA CTG ATT GAA TCA ACA GCA AAT ATG GAA AAT AAT CAA	1026
Lys Lys Ser Pro Leu Ile Glu Ser Thr Ala Asn Met Glu Asn Asn Gln	
300	305
CCA CAG AAG ACT TTT AAA AAC AAG GAA ACG TTG ATT ATT GAG CCA GAG	1074
Pro Gln Lys Thr Phe Lys Asn Lys Glu Thr Leu Ile Ile Glu Pro Glu	
315	320
AAA AAT GCA TCT CGA ATC GAG TCT CTG GAG CAA GAA AAG GCT GAT GAG	1122
Lys Asn Ala Ser Arg Ile Glu Ser Leu Glu Gln Glu Lys Ala Asp Glu	
330	335
GAG GAG GAA GGC AAG AAG GAT GAG TCC AGC TGC TCC AGT GAG GAG GAT	1170
Glu Glu Glu Gly Lys Lys Asp Glu Ser Ser Cys Ser Ser Glu Glu Asp	
345	350
GAG GAG GAT GAC TCC GAG TCC GAA GCG GAG ACA GAT AAG ACA AAA CCC	1218
Glu Glu Asp Asp Ser Glu Ser Glu Ala Glu Thr Asp Lys Thr Lys Pro	
365	370
ATG GCT TCT GTA ACT AAT GCT CAC ACT GCC AGC ACT CAG GCA GCT CCT	1266
Met Ala Ser Val Thr Asn Ala His Thr Ala Ser Thr Gln Ala Ala Pro	
380	385
GCC GCT GTG ACA ACA CCT ACT CTG TCT TCC AAC CAG GGG ACC CCT ACA	1314
Ala Ala Val Thr Thr Pro Thr Leu Ser Ser Asn Gln Gly Thr Pro Thr	
395	400
TCA CCT GTT AAA AAG TTT CCT ACA TCA ACT ACA AAA ATT TCT CCC AAA	1362
Ser Pro Val Lys Lys Phe Pro Thr Ser Thr Thr Lys Ile Ser Pro Lys	
410	415
GAA GAA GAA AGA AAA GAT GAA TCT CCT GCA TCC TGG AGG TTA GGA CTT	1410
Glu Glu Glu Arg Lys Asp Glu Ser Pro Ala Ser Trp Arg Leu Gly Leu	
425	430
AGA AAG ACT GGC AGT TAT GGT GCC GCG GCT GAG ATC ACT GCA TCT AAA	1458

45		46
Arg Lys Thr Gly Ser Tyr Gly Ala Leu Ala Glu Ile Thr Ala Ser Lys		
445	450	455
GAA GCT CAG AAG GAG AAA GAC ACT GCA GGC GTG ATA CGT TCA GCT TCG	1506	
Glu Ala Gln Lys Glu Lys Asp Thr Ala Gly Val Ile Arg Ser Ala Ser		
460	465	470
AGT CCC AGA CTC TCG TCC TCT TTG GAT AAT AAA GAA AAG GAG AAA GAC	1554	
Ser Pro Arg Leu Ser Ser Ser Leu Asp Asn Lys Glu Lys Glu Lys Asp		
475	480	485
AAT AAA GGA ACA AGA CTT GCA TAT GTC GCC CCT ACA ATC CCA AGG CGA	1602	
Asn Lys Gly Thr Arg Leu Ala Tyr Val Ala Pro Thr Ile Pro Arg Arg		
490	495	500
CTA GGC AGT ACG TCT GAC ATT GAA GAG AAG GAA AAC AGA GAG TCT TCA	1650	
Leu Gly Ser Thr Ser Asp Ile Glu Glu Lys Glu Asn Arg Glu Ser Ser		
505	510	515
AAT TTG CGA ACA AGT AGT TCT TAC ACA AGA AGA AAA TGG GAA GAT GAT	1698	
Asn Leu Arg Thr Ser Ser Ser Tyr Thr Arg Arg Lys Trp Glu Asp Asp		
525	530	535
CTT AAA AAA AAT AGT TCA ATC AAT GAA GGA TCT ACT TAC CAT AGA AGT	1746	
Leu Lys Lys Asn Ser Ser Ile Asn Glu Gly Ser Thr Tyr His Arg Ser		
540	545	550
ACC TCA AAT CGT TTG TGG GCT GAG GAT AGT ACT GAG AAA GAG AAG GAC	1794	
Thr Ser Asn Arg Leu Trp Ala Glu Asp Ser Thr Glu Lys Glu Lys Asp		
555	560	565
AGT GCT CCT ACC GCA GCG ACC ATT CTT GTT GCT CCA ACT GTT GTA AGT	1842	
Ser Ala Pro Thr Ala Ala Thr Ile Leu Val Ala Pro Thr Val Val Ser		
570	575	580
GCT GCA GCT TCT TCT ACC ACA GCC CTG ACC ACA ACT ACT GCT GGC ACT	1890	
Ala Ala Ala Ser Ser Thr Thr Ala Leu Thr Thr Thr Thr Ala Gly Thr		
585	590	595
CTT TCC TCC ACA TCA GAG GTC AGG GAG AGA CGC AGG TCA TAC CTC ACT	1938	
Leu Ser Ser Thr Ser Glu Val Arg Glu Arg Arg Arg Ser Tyr Leu Thr		
605	610	615
CCT GTT AGG GAT GAA GAG TCT GAA TCC CAA AGG AAA GCA AGA TCT AGA	1986	
Pro Val Arg Asp Glu Glu Ser Glu Ser Gln Arg Lys Ala Arg Ser Arg		
620	625	630
CAA GCA AGA CAG TCT AGA CGG TCA ACA CAG GGG GTG ACA CTG ACT GAC	2034	
Gln Ala Arg Gln Ser Arg Arg Ser Thr Gln Gly Val Thr Leu Thr Asp		
635	640	645
CTC CAG GAA GCC GAA AAG ACA ATA GGA AGA AGC CGT TCT ACG AGA ACC	2086	
Leu Gln Glu Ala Glu Lys Thr Ile Gly Arg Ser Arg Ser Thr Arg Thr		
650	655	660
AGA GAA CAA GAA AAC GAA GAA AAA GAC AAA GAA GAA AAG GAA AAG CAG	2130	
Arg Glu Gln Glu Asn Glu Glu Lys Asp Lys Glu Glu Lys Glu Lys Gln		
665	670	675
GAT AAA GAG AAA CAA GAA GAA AAG AAG GAG TCA GAA GTA TCT AGA GAA	2178	
Asp Lys Glu Lys Gln Glu Glu Lys Lys Glu Ser Glu Val Ser Arg Glu		
685	690	695
GAT GAA TAT AAG CAA AAG TAT TCC AGA ACA TAC GAT GAG ACT TAT GCA	2226	
Asp Glu Tyr Lys Gln Lys Tyr Ser Arg Thr Tyr Asp Glu Thr Tyr Ala		
700	705	710

47	48
CGT TAC AGA CCA GTG TCA ACT TCA AGT TCA AGC ACT CCG TCG TCC TCC	2274
Arg Tyr Arg Pro Val Ser Thr Ser Ser Ser Ser Thr Pro Ser Ser Ser	
715 720 725	
TCA CTT TCT ACT CTA GGC AGT TCA CTC TAT GCC TCA AGT CAG CTC AAC	2322
Ser Leu Ser Thr Leu Gly Ser Ser Leu Tyr Ala Ser Ser Gln Leu Asn	
730 735 740	
AGG CCA AAC AGC CTT GTA GGT ATA ACC TCT GCC TAC TCC CGG GGA TTA	2370
Arg Pro Asn Ser Leu Val Gly Ile Thr Ser Ala Tyr Ser Arg Gly Leu	
745 750 755 760	
ACC AAA GAC AAT GAA AGA GAG GGA GAG AAA AAA GAA GAG GAA AAA GAA	2418
Thr Lys Asp Asn Glu Arg Glu Gly Glu Lys Lys Glu Glu Glu Lys Glu	
765 770 775	
GGG GAA GAT AAG TCA CAA CCT AAA TCA ATC AGA GAA CGA CGG CGA CCA	2466
Gly Glu Asp Lys Ser Gln Pro Lys Ser Ile Arg Glu Arg Arg Arg Pro	
780 785 790	
AGA GAA AAA CGG AGG TCT ACT GGA GTC TCC TTC TGG ACA CAA GAT AGT	2514
Arg Glu Lys Arg Arg Ser Thr Gly Val Ser Phe Trp Thr Gln Asp Ser	
795 800 805	
GAT GAA AAT GAG CAA GAG CGG CAG TCA GAC ACC GAG GAT GGC TCC AGC	2562
Asp Glu Asn Glu Gln Glu Arg Gln Ser Asp Thr Glu Asp Gly Ser Ser	
810 815 820	
AAG AGG GAC ACT CAG ACG GAT TCT GTT TCC AGG TAT GAC AGC AGT TCC	2610
Lys Arg Asp Thr Gln Thr Asp Ser Val Ser Arg Tyr Asp Ser Ser Ser	
825 830 835 840	
ACG TCA TCA AGC GAT CGG TAT GAC TCC TTG CTG GGT CGT TCT GCC TCA	2658
Thr Ser Ser Ser Asp Arg Tyr Asp Ser Leu Leu Gly Arg Ser Ala Ser	
845 850 855	
TAC AGT TAC TTA GAA GAA AGG AAA CCA TAT GGT AGC CGA CTA GAA AAG	2706
Tyr Ser Tyr Leu Glu Glu Arg Lys Pro Tyr Gly Ser Arg Leu Glu Lys	
860 865 870	
GAT GAC TCA ACT GAC TTC AAA AAG CTT TAT GAA CAA ATC TTA GCT GAA	2754
Asp Asp Ser Thr Asp Phe Lys Lys Leu Tyr Glu Gln Ile Leu Ala Glu	
875 880 885	
AAT GAA AAA CTA AAG GCA CAG CTA CAT GAC ACA AAT ATG GAA CTA ACG	2802
Asn Glu Lys Leu Lys Ala Gln Leu His Asp Thr Asn Met Glu Leu Thr	
890 895 900	
GAT CTA AAG TTG CAG TTG GAA AAA GCT ACC CAG AGA CAA GAA CGA TTT	2850
Asp Leu Lys Leu Gln Leu Glu Lys Ala Thr Gln Arg Gln Glu Arg Phe	
905 910 915 920	
GCT GAC AGG TCA CTA TTG GAG ATG GAA AAA AGG GAA CGA AGA GCT CTA	2898
Ala Asp Arg Ser Leu Leu Glu Met Glu Lys Arg Glu Arg Arg Ala Leu	
925 930 935	
GAA AGA AGA ATA TCT GAG ATG GAA GAG GAG CTC AAA ATG TTA CCA GAC	2946
Glu Arg Arg Ile Ser Glu Met Glu Glu Glu Leu Lys Met Leu Pro Asp	
940 945 950	
TTA AAA GCA GAC AAC CAG AGG CTA AAG GAT GAA AAT GGG GCC TTG ATC	2994
Leu Lys Ala Asp Asn Gln Arg Leu Lys Asp Glu Asn Gly Ala Leu Ile	
955 960 965	
AGA GTT ATA AGC AAA CTT TCC AAG TAGGACAGAA AACACACAAG CGAAGCAGCG	3048
Arg Val Ile Ser Lys Leu Ser Lys 50	

49

50

970

975

GGACTTGCAC ACACTCCCCA GTGGACCACA TTGGCAGTCA CTGGACGCCA GAAAGAACCC 3108
 CTGGAGACTG TCATTTTCCG ATATCCTGCC AAACGCCCTC TTATCTAGGA GTTTGTGTTTC 3168
 GTTTAATCTT CTGCCCCACC CCCTTGGTTA TCAAGACCAT TGTTCATGT TAAAGCCGCT 3228
 GCTGAGAAGA TTTTITTTCA ATGACTGAGA AAAGTGTGTT ACAGCTCCAG CAAATAAAGA 3288
 AAGTGTTCAG GG 3300

【0118】配列番号：3

配列の長さ：1030

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

* トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源：

* 10 生物名：ヒト

配列

Met Lys Met Ala Asp Ala Lys Gln Lys Arg Asn Glu Gln Leu Lys Arg
 1 5 10 15
 Trp Ile Gly Ser Glu Thr Asp Leu Glu Pro Pro Val Val Lys Arg Gln
 20 25 30
 Lys Thr Lys Val Lys Phe Asp Asp Gly Ala Val Phe Leu Ala Ala Cys
 35 40 45
 Ser Ser Gly Asp Thr Asp Glu Val Leu Lys Leu Leu His Arg Gly Ala
 50 55 60
 Asp Ile Asn Tyr Ala Asn Val Asp Gly Leu Thr Ala Leu His Gln Ala
 65 70 75 80
 Cys Ile Asp Asp Asn Val Asp Met Val Lys Phe Leu Val Glu Asn Gly
 85 90 95
 Ala Asn Ile Asn Gln Pro Asp Asn Glu Gly Trp Ile Pro Leu His Ala
 100 105 110
 Ala Ala Ser Cys Gly Tyr Leu Asp Ile Ala Glu Phe Leu Ile Gly Gln
 115 120 125
 Gly Ala His Val Gly Ala Val Asn Ser Glu Gly Asp Thr Pro Leu Asp
 130 135 140
 Ile Ala Glu Glu Glu Ala Met Glu Glu Leu Leu Gln Asn Glu Val Asn
 145 150 155 160
 Arg Gln Gly Val Asp Ile Glu Ala Ala Arg Lys Glu Glu Glu Arg Ile
 165 170 175
 Met Leu Arg Asp Ala Arg Gln Trp Leu Asn Ser Gly His Ile Asn Asp
 180 185 190
 Val Arg His Ala Lys Ser Gly Gly Thr Ala Leu His Val Ala Ala Ala
 195 200 205
 Lys Gly Tyr Thr Glu Val Leu Lys Leu Leu Ile Gln Ala Gly Tyr Asp
 210 215 220
 Val Asn Ile Lys Asp Tyr Asp Gly Trp Thr Pro Leu His Ala Ala Ala
 225 230 235 240
 His Trp Gly Lys Glu Glu Ala Cys Arg Ile Leu Val Asp Asn Leu Cys
 245 250 255
 Asp Met Glu Met Val Asn Lys Val Gly Gln Thr Ala Phe Asp Val Ala
 260 265 270
 Asp Glu Asp Ile Leu Gly Tyr Leu Glu Glu Leu Gln Lys Lys Gln Asn
 275 280 285
 Leu Leu His Ser Glu Lys Arg Asp Lys Lys Ser Pro Leu Ile Glu Ser
 290 295 300
 Thr Ala Asn Met Asp Asn Asn Gln Ser Gln Lys Thr Phe Lys Asn Lys

51 52
 305 310 315 320
 Glu Thr Leu Ile Ile Glu Pro Glu Lys Asn Ala Ser Arg Ile Glu Ser
 325 330 335
 Leu Glu Gln Glu Lys Val Asp Glu Glu Glu Glu Gly Lys Lys Asp Glu
 340 345 350
 Ser Ser Cys Ser Ser Glu Glu Asp Glu Glu Asp Asp Ser Glu Ser Glu
 355 360 365
 Ala Glu Thr Asp Lys Thr Lys Pro Leu Ala Ser Val Thr Asn Ala Asn
 370 375 380
 Thr Ser Ser Thr Gln Ala Ala Pro Val Ala Val Thr Thr Pro Thr Val
 385 390 395 400
 Ser Ser Gly Gln Ala Thr Pro Thr Ser Pro Ile Lys Lys Phe Pro Thr
 405 410 415
 Thr Ala Thr Lys Ile Ser Pro Lys Glu Glu Arg Lys Asp Glu Ser
 420 425 430
 Pro Ala Thr Trp Arg Leu Gly Leu Arg Lys Thr Gly Ser Tyr Gly Ala
 435 440 445
 Leu Ala Glu Ile Thr Ala Ser Lys Glu Gly Gln Lys Glu Lys Asp Thr
 450 455 460
 Ala Gly Val Thr Arg Ser Ala Ser Ser Pro Arg Leu Ser Ser Ser Leu
 465 470 475 480
 Asp Asn Lys Glu Lys Glu Lys Asp Ser Lys Gly Thr Arg Leu Ala Tyr
 485 490 495
 Val Ala Pro Thr Ile Pro Arg Arg Leu Ala Ser Thr Ser Asp Ile Glu
 500 505 510
 Glu Lys Glu Asn Arg Asp Ser Ser Ser Leu Arg Thr Ser Ser Ser Tyr
 515 520 525
 Thr Arg Arg Lys Trp Glu Asp Asp Leu Lys Lys Asn Ser Ser Val Asn
 530 535 540
 Glu Gly Ser Thr Tyr His Lys Ser Cys Ser Phe Gly Arg Arg Gln Asp
 545 550 555 560
 Asp Leu Ile Ser Ser Ser Val Pro Ser Thr Thr Ser Thr Pro Thr Val
 565 570 575
 Thr Ser Ala Ala Gly Leu Gln Lys Ser Leu Leu Ser Ser Thr Ser Thr
 580 585 590
 Thr Thr Lys Ile Thr Thr Gly Ser Ser Ser Ala Gly Thr Gln Ser Ser
 595 600 605
 Thr Ser Asn Arg Leu Trp Ala Glu Asp Ser Thr Glu Lys Glu Lys Asp
 610 615 620
 Ser Val Pro Thr Ala Val Thr Ile Pro Val Ala Pro Thr Val Val Asn
 625 630 635 640
 Ala Ala Ala Ser Thr Thr Thr Leu Thr Thr Thr Thr Ala Gly Thr Val
 645 650 655
 Ser Ser Thr Thr Glu Val Arg Glu Arg Arg Arg Ser Tyr Leu Thr Pro
 660 665 670
 Val Arg Asp Glu Glu Ser Glu Ser Gln Arg Lys Ala Arg Ser Arg Gln
 675 680 685
 Ala Arg Gln Ser Arg Arg Ser Thr Gln Gly Val Thr Leu Thr Asp Leu
 690 695 700
 Gln Glu Ala Glu Lys Thr Ile Gly Arg Ser Arg Ser Thr Arg Thr Arg

53 54
 705 710 715 720
 Glu Gln Glu Asn Glu Glu Lys Glu Lys Glu Glu Lys Glu Lys Gln Asp
 725 730 735
 Lys Glu Lys Gln Glu Glu Lys Lys Glu Ser Glu Thr Ser Arg Glu Asp
 740 745 750
 Glu Tyr Lys Gln Lys Tyr Ser Arg Thr Tyr Asp Glu Thr Tyr Gln Arg
 755 760 765
 Tyr Arg Pro Val Ser Thr Ser Ser Ser Thr Thr Pro Ser Ser Ser Leu
 770 775 780
 Ser Thr Met Ser Ser Ser Leu Tyr Ala Ser Ser Gln Leu Asn Arg Pro
 785 790 795 800
 Asn Ser Leu Val Gly Ile Thr Ser Ala Tyr Ser Arg Gly Ile Thr Lys
 805 810 815
 Glu Asn Glu Arg Glu Gly Glu Lys Arg Glu Glu Glu Lys Glu Gly Glu
 820 825 830
 Asp Lys Ser Gln Pro Lys Ser Ile Arg Glu Arg Arg Arg Pro Arg Glu
 835 840 845
 Lys Arg Arg Ser Thr Gly Val Ser Phe Trp Thr Gln Asp Ser Asp Glu
 850 855 860
 Asn Glu Gln Glu Gln Gln Ser Asp Thr Glu Glu Gly Ser Asn Lys Lys
 865 870 875 880
 Glu Thr Gln Thr Asp Ser Ile Ser Arg Tyr Glu Thr Ser Ser Thr Ser
 885 890 895
 Ala Gly Asp Arg Tyr Asp Ser Leu Leu Gly Arg Ser Gly Ser Tyr Ser
 900 905 910
 Tyr Leu Glu Glu Arg Lys Pro Tyr Ser Ser Arg Leu Glu Lys Asp Asp
 915 920 925
 Ser Thr Asp Phe Lys Lys Leu Tyr Glu Gln Ile Leu Ala Glu Asn Glu
 930 935 940
 Lys Leu Lys Ala Gln Leu His Asp Thr Asn Met Glu Leu Thr Asp Leu
 945 950 955 960
 Lys Leu Gln Leu Glu Lys Ala Thr Gln Arg Gln Glu Arg Phe Ala Asp
 965 970 975
 Arg Ser Leu Leu Glu Met Glu Lys Arg Glu Arg Arg Ala Leu Glu Arg
 980 985 990
 Arg Ile Ser Glu Met Glu Glu Glu Leu Lys Met Leu Pro Asp Leu Lys
 995 1000 1005
 Ala Asp Asn Gln Arg Leu Lys Asp Glu Asn Gly Ala Leu Ile Arg Val
 1010 1015 1020
 Ile Ser Lys Leu Ser Lys
 1025 1030

【0119】配列番号：4

配列の長さ：3102

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

* トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源：

* 生物名：ヒト

配列

ATG AAG ATG GCG GAC GCG AAG CAG AAG CGG AAC GAG CAG CTG AAA CGC 48
 Met Lys Met Ala Asp Ala Lys Gln Lys Arg Asn Glu Gln Leu Lys Arg
 1 5 10 15
 TGG ATC GGC TCC GAG ACG GAC CTC GAG CCT CCG GTG GTG AAG CGC CAG 96

55															56
Trp	Ile	Gly	Ser	Glu	Thr	Asp	Leu	Glu	Pro	Pro	Val	Val	Lys	Arg	Gln
		20						25					30		
AAG	ACC	AAG	GTG	AAG	TTC	GAC	GAT	GGC	GCC	GTC	TTC	CTG	GCT	GCT	TGC
Lys	Thr	Lys	Val	Lys	Phe	Asp	Asp	Gly	Ala	Val	Phe	Leu	Ala	Ala	Cys
		35						40					45		
TCC	AGC	GGC	GAC	ACG	GAC	GAG	GTC	CTC	AAG	CTG	CTG	CAC	CGC	GGC	GCC
Ser	Ser	Gly	Asp	Thr	Asp	Glu	Val	Leu	Lys	Leu	Leu	His	Arg	Gly	Ala
		50						55					60		
GAC	ATC	AAT	TAC	GCC	AAT	GTG	GAC	GGA	CTC	ACT	GCC	CTG	CAC	CAG	GCT
Asp	Ile	Asn	Tyr	Ala	Asn	Val	Asp	Gly	Leu	Thr	Ala	Leu	His	Gln	Ala
		65						70					75		80
TGC	ATT	GAT	GAC	AAT	GTT	GAT	ATG	GTG	AAG	TTT	CTG	GTA	GAA	AAT	GGA
Cys	Ile	Asp	Asp	Asn	Val	Asp	Met	Val	Lys	Phe	Leu	Val	Glu	Asn	Gly
				85					90					95	
GCA	AAT	ATT	AAT	CAA	CCT	GAT	AAT	GAA	GGC	TGG	ATA	CCA	CTA	CAT	GCA
Ala	Asn	Ile	Asn	Gln	Pro	Asp	Asn	Glu	Gly	Trp	Ile	Pro	Leu	His	Ala
				100					105					110	
GCA	GCT	TCC	TGT	GGA	TAT	CTT	GAT	ATT	GCA	GAG	TTT	TTG	ATT	GGT	CAA
Ala	Ala	Ser	Cys	Gly	Tyr	Leu	Asp	Ile	Ala	Glu	Phe	Leu	Ile	Gly	Gln
				115					120					125	
GGA	GCA	CAT	GTA	GGG	GCT	GTC	AAC	AGT	GAA	GGA	GAT	ACA	CCT	TTA	GAT
Gly	Ala	His	Val	Gly	Ala	Val	Asn	Ser	Glu	Gly	Asp	Thr	Pro	Leu	Asp
				130					135					140	
ATT	GCG	GAG	GAG	GAG	GCA	ATG	GAA	GAG	CTA	CTT	CAA	AAT	GAA	GTT	AAT
Ile	Ala	Glu	Glu	Glu	Ala	Met	Glu	Glu	Leu	Leu	Gln	Asn	Glu	Val	Asn
									145					150	
CGG	CAA	GGG	GTT	GAT	ATA	GAA	GCA	GCT	CGA	AAG	GAA	GAA	GAA	CGG	ATC
Arg	Gln	Gly	Val	Asp	Ile	Glu	Ala	Ala	Arg	Lys	Glu	Glu	Glu	Arg	Ile
				165					170					175	
ATG	CTT	AGA	GAT	GCC	AGG	CAG	TGG	CTA	AAT	AGT	GGT	CAT	ATA	AAT	GAT
Met	Leu	Arg	Asp	Ala	Arg	Gln	Trp	Leu	Asn	Ser	Gly	His	Ile	Asn	Asp
				180					185					190	
GTC	CGG	CAT	GCA	AAA	TCT	GGA	GGT	ACA	GCA	CTT	CAC	GTT	GCA	GCT	GCT
Val	Arg	His	Ala	Lys	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Leu	His	Val	Ala	Ala	Ala
				195					200					205	
AAA	GGC	TAT	ACG	GAA	GTT	TTA	AAA	CTT	TTA	ATA	CAG	GCA	GGC	TAT	GAT
Lys	Gly	Tyr	Thr	Glu	Val	Leu	Lys	Leu	Leu	Ile	Gln	Ala	Gly	Tyr	Asp
				210					215					220	
GTT	AAT	ATT	AAA	GAC	TAT	GAT	GGC	TGG	ACA	CCT	CTT	CAT	GCT	GCA	GCT
Val	Asn	Ile	Lys	Asp	Tyr	Asp	Gly	Trp	Thr	Pro	Leu	His	Ala	Ala	Ala
				225					230					235	
CAT	TGG	GGT	AAA	GAA	GAA	GCA	TGT	CGA	ATT	TTA	GTG	GAC	AAT	CTG	TGT
His	Trp	Gly	Lys	Glu	Glu	Ala	Cys	Arg	Ile	Leu	Val	Asp	Asn	Leu	Cys
				245					250					255	
GAT	ATG	GAG	ATG	GTC	AAC	AAA	GTG	GGC	CAA	ACA	GCC	TTT	GAT	GTA	GCA
Asp	Met	Glu	Met	Val	Asn	Lys	Val	Gly	Gln	Thr	Ala	Phe	Asp	Val	Ala
				260					265					270	
GAT	GAA	GAC	ATT	TTA	GGA	TAT	TTA	GAA	GAG	TTG	CAA	AAG	AAA	CAA	AAT
Asp	Glu	Asp	Ile	Leu	Gly	Tyr	Leu	Glu	Glu	Leu	Gln	Lys	Lys	Gln	Asn
				275					280	50				285	

57	CTG CTC CAT AGT GAA AAA CGG GAC AAG AAA TCT CCA CTA ATT GAA TCA	58	912
	Leu Leu His Ser Glu Lys Arg Asp Lys Lys Ser Pro Leu Ile Glu Ser		
290	295	300	
ACA GCA AAT ATG GAC AAT AAT CAG TCA CAG AAG ACC TTT AAA AAC AAA			960
Thr Ala Asn Met Asp Asn Asn Gln Ser Gln Lys Thr Phe Lys Asn Lys			
305	310	315	320
GAG ACG TTG ATT ATT GAA CCA GAG AAA AAT GCA TCC CGT ATT GAA TCT			1008
Glu Thr Leu Ile Ile Glu Pro Glu Lys Asn Ala Ser Arg Ile Glu Ser			
325	330	335	
CTG GAA CAA GAA AAG GTT GAT GAA GAA GAA GGA AAG AAG GAT GAG			1056
Leu Glu Gln Glu Lys Val Asp Glu Glu Glu Glu Gly Lys Lys Asp Glu			
340	345	350	
TCT AGC TGC TCT AGT GAA GAA GAT GAG GAA GAT GAC TCG GAA TCA GAA			1104
Ser Ser Cys Ser Ser Glu Glu Asp Glu Glu Asp Asp Ser Glu Ser Glu			
355	360	365	
GCT GAA ACA GAT AAG ACA AAA CCC CTG GCT TCT GTA ACT AAT GCC AAC			1152
Ala Glu Thr Asp Lys Thr Lys Pro Leu Ala Ser Val Thr Asn Ala Asn			
370	375	380	
ACT TCT AGT ACA CAA GCA GCT CCT GTA GCT GTT ACA ACA CCT ACT GTG			1200
Thr Ser Ser Thr Gln Ala Ala Pro Val Ala Val Thr Thr Pro Thr Val			
385	390	395	400
TCA TCA GGT CAA GCA ACA CCT ACA TCA CCT ATT AAA AAG TTT CCA ACC			1248
Ser Ser Gly Gln Ala Thr Pro Thr Ser Pro Ile Lys Lys Phe Pro Thr			
405	410	415	
ACA GCT ACA AAA ATT TCT CCC AAA GAA GAA GAG AGA AAA GAT GAG TCT			1296
Thr Ala Thr Lys Ile Ser Pro Lys Glu Glu Glu Arg Lys Asp Glu Ser			
420	425	430	
CCT GCA ACT TGG AGG TTA GGA CTT AGA AAG ACG GGC AGC TAT GGT GCA			1344
Pro Ala Thr Trp Arg Leu Gly Leu Arg Lys Thr Gly Ser Tyr Gly Ala			
435	440	445	
CTT GCT GAA ATC ACA GCA TCT AAA GAG GGT CAG AAA GAA AAA GAT ACT			1392
Leu Ala Glu Ile Thr Ala Ser Lys Glu Gly Gln Lys Glu Lys Asp Thr			
450	455	460	
GCA GGT GTT ACA CGT TCA GCT TCA AGT CCC AGA CTT TCC TCC TCT TTG			1440
Ala Gly Val Thr Arg Ser Ala Ser Ser Pro Arg Leu Ser Ser Ser Leu			
465	470	475	480
GAT AAT AAA GAA AAG GAG AAA GAT AGT AAA GGA ACT AGG CTT GCA TAT			1488
Asp Asn Lys Glu Lys Glu Lys Asp Ser Lys Gly Thr Arg Leu Ala Tyr			
485	490	495	
GTT GCA CCT ACA ATA CCA AGA CGA CTA GCC AGT ACA TCT GAC ATT GAA			1536
Val Ala Pro Thr Ile Pro Arg Arg Leu Ala Ser Thr Ser Asp Ile Glu			
500	505	510	
GAG AAA GAA AAC AGA GAT TCT TCA AGT TTG CGA ACA AGT AGT TCA TAT			1584
Glu Lys Glu Asn Arg Asp Ser Ser Ser Leu Arg Thr Ser Ser Ser Tyr			
515	520	525	
ACA AGG AGA AAA TGG GAA GAT GAT CTT AAA AAA AAT AGC TCA GTT AAT			1632
Thr Arg Arg Lys Trp Glu Asp Asp Leu Lys Lys Asn Ser Ser Val Asn			
530	535	540	
GAA GGA TCA ACG TAT CAT AAA AGT TGC TCC TTT GGT AGA AGA CAA GAT			1680
Glu Gly Ser Thr Tyr His Lys Ser Cys Ser Phe Gly Arg Arg Gln Asp			

545	59	550	555	60	560
GAT TTG ATT AGT TCT AGT GTT CCA AGC ACC ACA TCA ACA CCA ACA GTT					1728
Asp Leu Ile Ser Ser Ser Val Pro Ser Thr Thr Ser Thr Pro Thr Val					
	565	570	575		1776
ACC TCT GCA GCT GGG CTT CAG AAA AGC CTG CTT TCC AGC ACA AGC ACT					
Thr Ser Ala Ala Gly Leu Gln Lys Ser Leu Leu Ser Ser Thr Ser Thr					
	580	585	590		1824
ACT ACA AAG ATT ACA ACG GGT TCT TCC TCA GCA GGC ACA CAA AGC AGT					
Thr Thr Lys Ile Thr Thr Gly Ser Ser Ser Ala Gly Thr Gln Ser Ser					
	595	600	605		1872
ACC TCA AAT CGT TTG TGG GCT GAG GAT AGT ACT GAG AAA GAA AAG GAC					
Thr Ser Asn Arg Leu Trp Ala Glu Asp Ser Thr Glu Lys Glu Lys Asp					
	610	615	620		1920
AGT GTT CCT ACG GCA GTG ACC ATT CCT GTT GCT CCA ACT GTT GTA AAT					
Ser Val Pro Thr Ala Val Thr Ile Pro Val Ala Pro Thr Val Val Asn					
	625	630	635		1968
GCT GCA GCT TCT ACC ACA ACC CTG ACT ACA ACT ACT GCT GGC ACT GTC					
Ala Ala Ala Ser Thr Thr Thr Leu Thr Thr Thr Thr Ala Gly Thr Val					
	645	650	655		2016
TCC TCC ACA ACA GAG GTC AGG GAG AGA CGC AGA TCA TAC CTC ACT CCT					
Ser Ser Thr Thr Glu Val Arg Glu Arg Arg Arg Ser Tyr Leu Thr Pro					
	660	665	670		2064
GTT AGG GAT GAA GAG TCT GAA TCC CAA AGA AAA GCA AGA TCT AGA CAA					
Val Arg Asp Glu Glu Ser Glu Ser Gln Arg Lys Ala Arg Ser Arg Gln					
	675	680	685		2112
GCA AGA CAA TCT AGA AGA TCA ACA CAG GGA GTG ACA TTA ACT GAT CTT					
Ala Arg Gln Ser Arg Arg Ser Thr Gln Gly Val Thr Leu Thr Asp Leu					
	690	695	700		2160
CAA GAA GCT GAG AAA ACA ATA GGA AGA AGT CGT TCT ACC CGA ACC AGA					
Gln Glu Ala Glu Lys Thr Ile Gly Arg Ser Arg Ser Thr Arg Thr Arg					
	705	710	715		2208
GAA CAA GAA AAT GAA GAA AAA GAA AAA GAG GAA AAA GAG AAA CAA GAT					
Glu Gln Glu Asn Glu Glu Lys Glu Lys Glu Glu Lys Glu Lys Gln Asp					
	725	730	735		2256
AAA GAG AAA CAA GAA GAA AAG AAG GAG TCA GAA ACA TCT AGA GAA GAT					
Lys Glu Lys Gln Glu Glu Lys Lys Glu Ser Glu Thr Ser Arg Glu Asp					
	740	745	750		2304
GAA TAT AAA CAA AAG TAC TCC AGA ACG TAT GAT GAG ACT TAC CAG CGT					
Glu Tyr Lys Gln Lys Tyr Ser Arg Thr Tyr Asp Glu Thr Tyr Gln Arg					
	755	760	765		2352
TAT AGG CCA GTA TCA ACT TCA AGT TCA ACC ACT CCA TCC TCT TCA CTT					
Tyr Arg Pro Val Ser Thr Ser Ser Ser Thr Thr Pro Ser Ser Ser Leu					
	770	775	780		2400
TCT ACT ATG AGC AGT TCA CTG TAT GCT TCA AGT CAA CTA AAC AGG CCA					
Ser Thr Met Ser Ser Ser Leu Tyr Ala Ser Ser Gln Leu Asn Arg Pro					
	785	790	795		2448
AAT AGT CTT GTA GGC ATA ACT TCT GCT TAC TCC AGA GGA ATA ACA AAA					
Asn Ser Leu Val Gly Ile Thr Ser Ala Tyr Ser Arg Gly Ile Thr Lys					
	805	810	815		2496
GAA AAT GAA AGA GAG GGA GAA AAA AGA GAG GAG GAG AAA GAA GGA GAA					

61		62
Glu Asn Glu Arg Glu Gly Glu Lys Arg Glu Glu Glu Lys Glu Gly Glu		
820	825	830
GAT AAA TCA CAA CCT AAA TCA ATC AGA GAA CGA CGA CGA CCA AGA GAG	2544	
Asp Lys Ser Gln Pro Lys Ser Ile Arg Glu Arg Arg Arg Pro Arg Glu		
835	840	845
AAA AGA AGA TCT ACA GGA GTT TCA TTT TGG ACA CAA GAT AGT GAT GAA	2592	
Lys Arg Arg Ser Thr Gly Val Ser Phe Trp Thr Gln Asp Ser Asp Glu		
850	855	860
AAT GAA CAA GAA CAA CAA TCA GAC ACA GAA GAG GGA TCC AAT AAG AAA	2640	
Asn Glu Gln Glu Gln Gln Ser Asp Thr Glu Glu Gly Ser Asn Lys Lys		
865	870	875
GAA ACT CAG ACG GAT TCC ATT TCT AGA TAT GAA ACC AGT TCT ACA TCA	2688	
Glu Thr Gln Thr Asp Ser Ile Ser Arg Tyr Glu Thr Ser Ser Thr Ser		
885	890	895
GCT GGT GAT CGA TAT GAT TCC TTG CTG GGT CGC TCT GGA TCA TAC AGT	2736	
Ala Gly Asp Arg Tyr Asp Ser Leu Leu Gly Arg Ser Gly Ser Tyr Ser		
900	905	910
TAC TTA GAA GAA AGA AAA CCT TAC AGC AGC AGG CTA GAA AAG GAT GAC	2784	
Tyr Leu Glu Glu Arg Lys Pro Tyr Ser Ser Arg Leu Glu Lys Asp Asp		
915	920	925
TCA ACT GAC TTT AAA AAG CTT TAT GAA CAA ATT CTA GCT GAA AAT GAA	2832	
Ser Thr Asp Phe Lys Lys Leu Tyr Glu Gln Ile Leu Ala Glu Asn Glu		
930	935	940
AAG CTG AAG GCA CAG CTA CAT GAT ACA AAT ATG GAA CTA ACA GAT CTT	2880	
Lys Leu Lys Ala Gln Leu His Asp Thr Asn Met Glu Leu Thr Asp Leu		
945	950	955
AAA TTA CAG TTG GAA AAG GCC ACC CAG AGA CAA GAA AGA TTT GCT GAT	2928	
Lys Leu Gln Leu Glu Lys Ala Thr Gln Arg Gln Glu Arg Phe Ala Asp		
965	970	975
AGA TCA CTG TTG GAA ATG GAA AAA AGG GAA CGA AGA GCT CTA GAA AGA	2976	
Arg Ser Leu Leu Glu Met Glu Lys Arg Glu Arg Arg Ala Leu Glu Arg		
980	985	990
AGA ATA TCT GAA ATG GAA GAA GAG CTC AAA ATG TTA CCA GAC CTA AAA	3024	
Arg Ile Ser Glu Met Glu Glu Glu Lys Met Leu Pro Asp Leu Lys		
995	1000	1005
GCA GAC AAC CAG AGG CTA AAG GAT GAA AAT GGG GCC TTG ATC AGA GTT	3072	
Ala Asp Asn Gln Arg Leu Lys Asp Glu Asn Gly Ala Leu Ile Arg Val		
1010	1015	1020
ATA AGC AAA CTT TCC AAA TAAAAAAAAA AA	3102	
Ile Ser Lys Leu Ser Lys		
1025	1030	

【図面の簡単な説明】

【図1】Rhoタンパク質結合性タンパク質の精製結果を示した図である。結果は、3回の独立した実験の代表例である。レーン1：GST、レーン2：GDP・GST-Rho、レーン3：GTPγS・GST-Rho、レーン4：GTPγS・GST-Rho^{A1+37}、レーン5：GDP・GST-H-Ras、レーン6：GTPγS・GST-H-Ras。

【図2】Mono Q カラム・クロマトグラフィーによ

るp164の精製の結果を示した図である。CHAPS 溶出画分をMono Q カラムにかけ、p164をNaCl直線勾配で溶出した。結果は3回の独立した実験の代表例である。

【図3】アフィニティーカラムクロマトグラフィーから溶出された画分を抗ミオシン結合サブユニット抗体でイムノプロットした結果を示した図である。結果は、3回の独立した実験の代表例である。レーン1：GST、レーン2：GDP・GST-RhoA、レーン3：GTP

γ S・GST-RhoA、レーン4:GTP γ S・GST-RhoA^{A1837}、レーン5:GDP・GST-Rac1、レーン6:GTP γ S・GST-Rac1、レーン7:GDP・GST-H-Ras、レーン8:GTP γ S・GST-H-Ras。

【図4】アフィニティークラムクロマトグラフィーから溶出された画分を抗触媒サブユニット抗体でイムノプロットした結果を示した図である。結果は、3回の独立した実験の代表例である。レーン1:GST、レーン2:GDP・GST-RhoA、レーン3:GTP γ S・GST-RhoA、レーン4:GTP γ S・GST-RhoA^{A1837}、レーン5:GDP・GST-Rac1、レーン6:GTP γ S・GST-Rac1、レーン7:GDP・GST-H-Ras、レーン8:GTP γ S・GST-H-Ras。

【図5】アフィニティークラムクロマトグラフィーから溶出された画分によるウシ・ミオシン軽鎖フォスファターゼ活性を示した図である。結果は、3回の独立した実験の代表例である。

【図6】インビトロ・トランスレーションによって作製したラット・ミオシン結合サブユニットと活性型Rhoタンパク質との結合を測定した結果を示した図である。レーン1:GST、レーン2:GDP・GST-RhoA、レーン3:GTP γ S・GST-RhoA、レーン4:GTP γ S・GST-RhoA^{A1837}。

【図7】組換えラット・ミオシン結合サブユニットが、p122RhoGAPのRhoGTPase活性化能力に与える影響を示した図である。結果は、3回の独立した実験の代表例である。丸印はMBPの存在下、四角形はMBP-Nの存在下、三角形はMBP-Cの存在下での結果を示す。また、黒塗りの印はp122RhoGAPの存在下、白塗りの印はp122RhoGAPの非存在下での結果を示す。

【図8】p164によるラットのミオシン結合サブユニットのリン酸化を、GTP γ S・GST-RhoAが促進することを示した図である。レーン1:GST、レーン2:GDP・GST-RhoA、レーン3:GTP γ S・GST-RhoA。矢印は、ミオシン結合サブユニットのSDS-PAGE電気泳動上の位置を示す。

【図9】p164によるS6ペプチドのリン酸化を示した図である。黒四角形:GTP γ S・RhoA（翻訳後修飾型）、白四角形:GDP・RhoA（翻訳後修飾 *

*型）、黒丸:GTP γ S・GST-RhoA（非翻訳後修飾型）、白丸:GDP・GST-RhoA（非翻訳後修飾型）。

【図10】酵母ツー・ハイブリッド・システム(two hybrid system)によるミオシン結合サブユニットとRhoAタンパク質との結合を示した図である。

【図11】p164によるニワトリのミオシン結合サブユニットのリン酸化をGTP γ S・GST-RhoAが促進することを示した図である。レーン1:GST、レーン2:GDP・GST-RhoA、レーン3:GTP γ S・GST-RhoA、レーン4:GTP γ S・GST-RhoA^{A1837}、レーン5:GDP・GST-Rac1、レーン6:GTP γ S・GST-Rac1。レーン上の数字は、リン酸化の程度を、GST（レーン1）の場合を1.0としたときの相対値で表している。

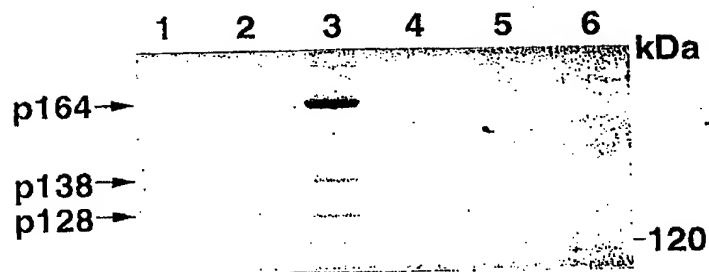
【図12】p164濃度依存的なニワトリ・ミオシン結合サブユニットのチオリン酸化とミオシン軽鎖フォスファターゼ活性の阻害を示した図である。黒丸および白丸は、それぞれGTP γ S・GST-RhoA存在または非存在下でのミオシン結合サブユニットへの³⁵Sチオリン酸の取り込みを示す。黒四角形および白四角形は、それぞれGTP γ S・GST-RhoA存在または非存在下、ATP γ Sの存在下でリン酸化したp164を用いた場合でのミオシン軽鎖フォスファターゼの酵素活性を示す。菱形はATP γ Sの非存在下（即ちリン酸化していないp164を用いた場合での）ミオシン軽鎖フォスファターゼの酵素活性を示す。

【図13】RhoAまたはRhoA^{V8114}を過剰に発現させた各NIH/3T3細胞株内でのミオシン結合サブユニットのリン酸化の程度を示した図である。

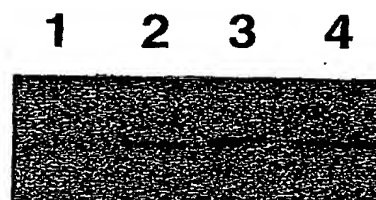
【図14】RhoAまたはRhoA^{V8114}を過剰に発現させた各NIH/3T3細胞株内でのミオシン軽鎖のリン酸化の程度を示した図である。

【図15】RhoAによって誘導されたミオシン結合サブユニット(MBS)の細胞内分布の変化を示した図である。COS7細胞に、Myc-MBSおよびHA-RhoAまたはHA-RhoA^{V8114}をトランスフェクトした。その後、細胞抽出液よりサイトゾル画分および膜(particulate)画分を調製し、イムノプロットすることによってMBS量を測定した。結果は、3回の独立した実験からの代表例である。

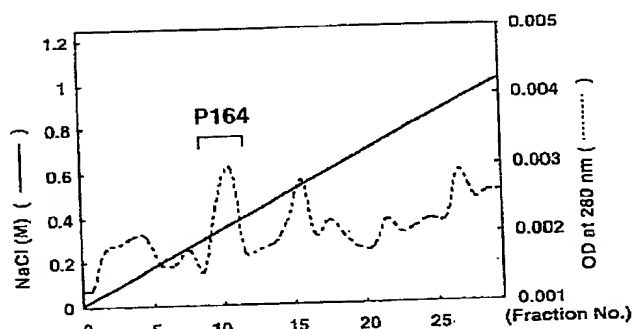
【図1】



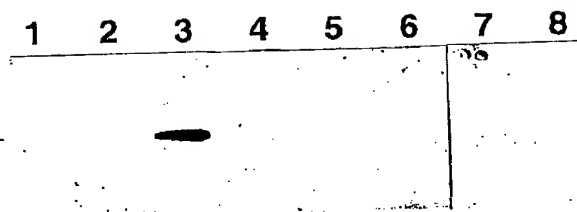
【図6】



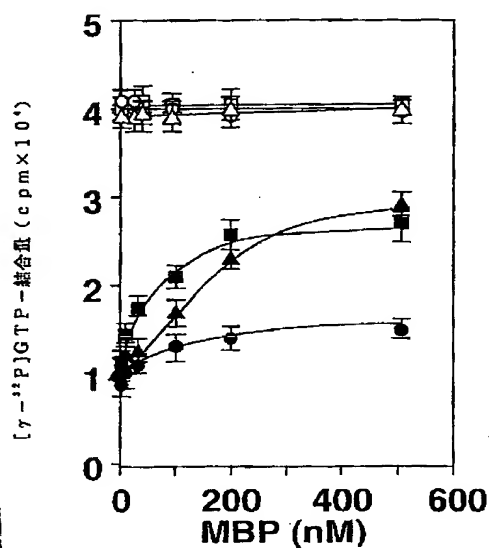
【図2】



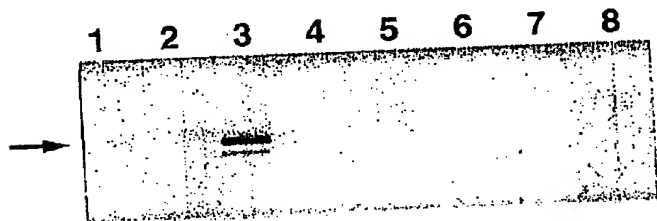
【図4】



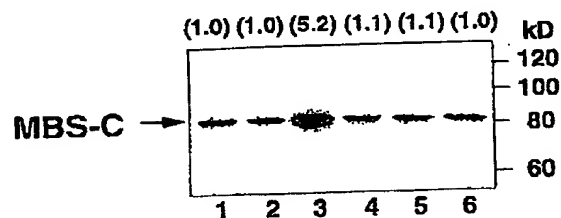
【図7】



【図3】

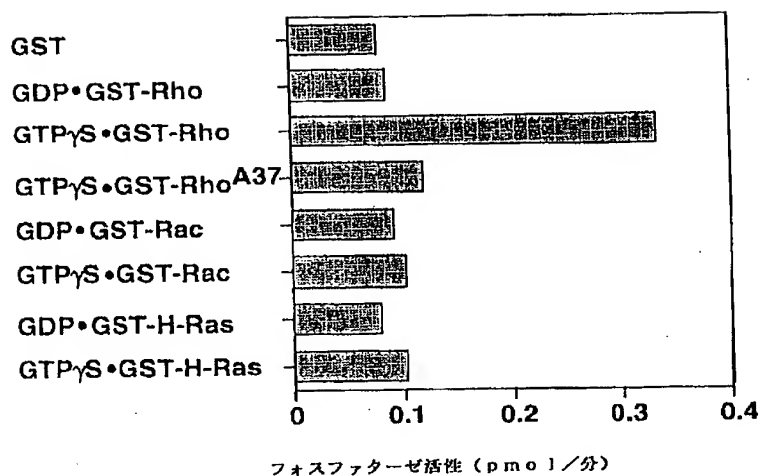


【図11】

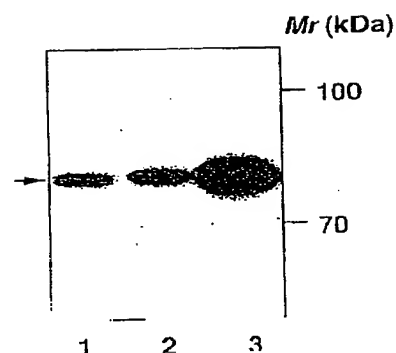


BEST AVAILABLE COPY

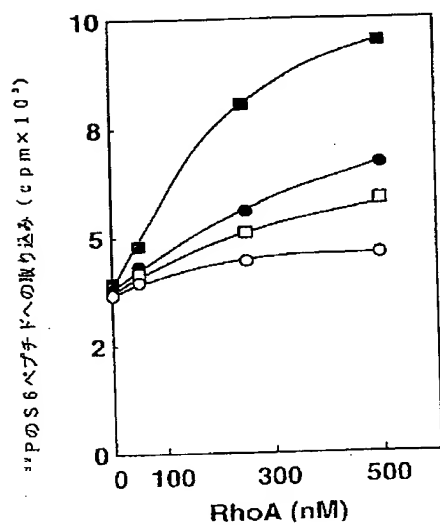
【図5】



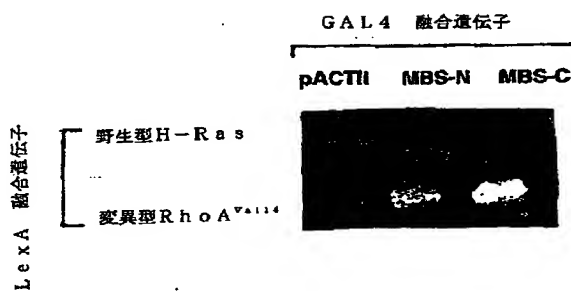
【図8】



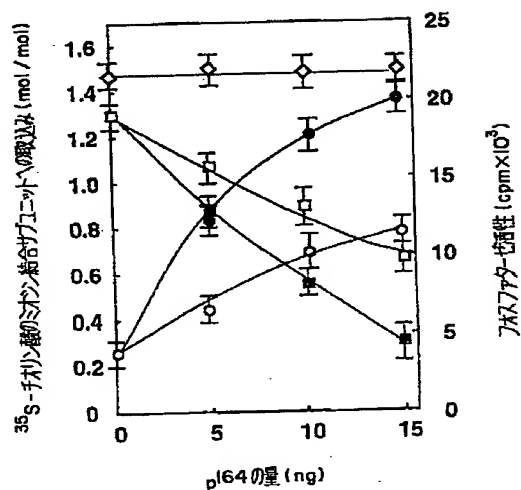
【図9】



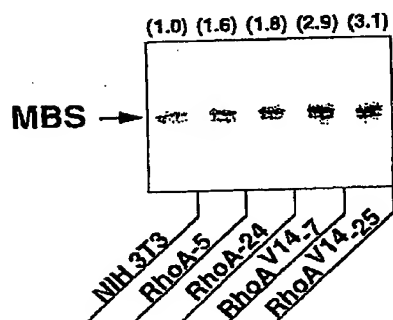
【図10】



【図12】

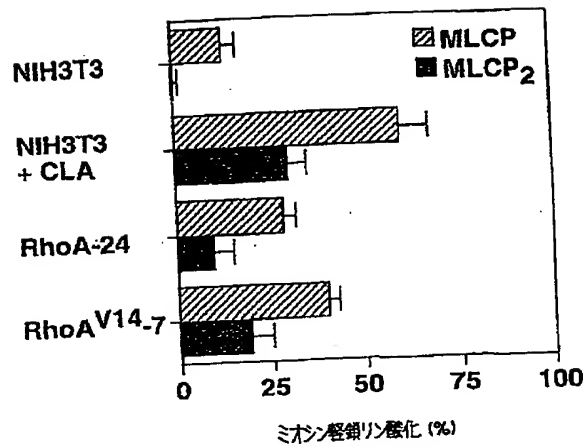


【図13】

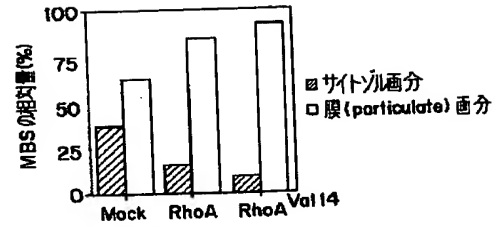


BEST AVAILABLE COPY

【図14】



【図15】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

C 0 7 K 14/78

C 1 2 N 1/19

1/21

5/10

C 1 2 P 21/02

C 1 2 Q 1/48

識別記号

庁内整理番号

9452-4B

F I

C 1 2 P 21/02

C 1 2 Q 1/48

A 6 1 K 37/02

C 1 2 N 5/00

技術表示箇所

C

A

A B E

A B R

A C B

B

(72) 発明者 高 橋 信 明

神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-5 麒麟

醸麦酒株式会社基盤技術研究所内

BEST AVAILABLE COPY